TECHNIQUE

MICROBIOLOGIQUE

ET SÉROTHÉRAPIQUE

PRINCIPAUX TRAVAUX DU MÊME AUTEUR :

Étude expérimentale sur la Révulsion. Paris, J.-B. Baillière, 1891. 1 vol. in-8, 170 pages, 2 planches (Ouvrage couronné par l'Université de Lyon).

Contribution à l'étude de la Révulsion cutanée (Mémoire couronné par l'Académie des Sciences, prix de physiologie thérapeutique, 1895).

Traité élémentaire d'hygiène (en collaboration avec M. Robinet, agrégé de l'Université). Paris, J.-B. Baillière, 1896, 1 vol. in-8, 250 pages, 74 figures.

Étuve à désinfection par circulation d'un courant de vapeur sous pression (en collaboration avec M. le professeur Vaillard) (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1895, et *Annales d'Hygiène*, 1895).

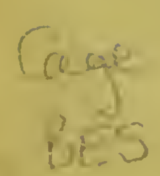
Contribution à l'étude du Vibrion septique (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1895).

Recherche des bactéries pathogènes dans les eaux (Association française pour l'Avancement des Sciences, 1895).

Recherches bactériologiques sur la fièvre typhoïde (*Revue de médecine*, 1897).

Article *Bactérie* dans le Dictionnaire de médecine de Littré, *18e édition*, 1898, p. 1743.

1228-01. — Corbeil. Imprimerie Éd. Crété.



TECHNIQUE MICROBIOLOGIQUE ET SÉROTHÉRAPIQUE

(MICROBES PATHOGÈNES DE L'HOMME ET DES ANIMAUX)

GUIDE DU MÉDECIN ET DU VÉTÉRINAIRE POUR LES TRAVAUX DU LABORATOIRE

PAR

Le Dr Albert BESSON

ANCIEN CHEF DE LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE DES HOPITAUX MILITAIRES
CHEF DU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE A L'HOPITAL PÉAN
LAURÉAT DE L'INSTITUT

DEUXIÈME ÉDITION, REVUE, CORRIGÉE ET AUGMENTÉE

Avec 289 figures intercalées dans le texte

NOIRES ET COLORIÉES



PARIS
LIBRAIRIE J.-B. BAILLIÈRE ET FILS
19, rue Hautefeuille, près du boulevard Saint-Germain

1902



PRÉFACE

DE LA PREMIÈRE ÉDITION

La Microbiologie constitue aujourd'hui une branche importante des études médicales ; tout médecin doit être capable de se livrer aux recherches élémentaires, telles que celles du Bacille de la tuberculose, du Bacille de la diphtérie, etc. ; toutes les Facultés ont installé des laboratoires, où les élèves sont initiés à l'étude des bactéries.

Ce livre est destiné à guider le médecin dans les travaux du laboratoire ; notre préoccupation a été de faire un véritable vademecum, que le débutant pourra suivre pas à pas et où l'observateur exercé trouvera les renseignements de nature à le diriger dans ses recherches.

Nous croyons avoir acquis quelque expérience dans les laboratoires de Bactériologie que nous avons dirigés, et dans les cours d'enseignement technique que nous avons professés.

Nous avons systématiquement écarté toute considération théorique, toute indication bibliographique, qui sont fournies par les traités classiques de Bactériologie.

La première partie comprend la *technique générale*, applicable à tous les microbes. Dans chaque chapitre, nous décrivons les différents procédés qui ont été recommandés par les auteurs, mais nous indiquons toujours un procédé de choix, que nous conseillons et dont la mise en pratique donnera toute satisfaction au débutant.

La seconde partie traite des particularités de la *technique spéciale*, propres à chaque microbe.

Nous avons joint à l'étude des Bactéries celle des Champignons parasites et aussi celle des Protozoaires, dont le rôle pathogène est bien connu aujourd'hui et qui tendent à prendre une place de plus en plus importante dans l'histoire naturelle médicale.

La troisième et dernière partie comprend l'exposé rapide des méthodes d'*analyse bactériologique de l'air* et *de l'eau*.

Les figures ont été l'objet de tous nos soins ; à propos de chaque microbe, nous avons nous-même dessiné en couleur, d'après nos préparations, l'aspect que l'on obtient en suivant les indications du texte : l'élève y trouvera un guide sûr pour l'interprétation de ses préparations.

Qu'il nous soit permis de remercier ici les Maîtres qui nous ont initié à l'étude de la Bactériologie ; nous avons fait de larges emprunts à leur enseignement : si ce livre trouve quelque faveur, nous n'oublierons pas que c'est à eux qu'en revient tout l'honneur.

A. Besson.

15 octobre 1897.

PRÉFACE

DE LA DEUXIÈME ÉDITION

En réimprimant ce livre, nous nous sommes efforcé de le tenir au courant des progrès de la science, tout en lui conservant son caractère essentiellement pratique.

De nouveaux chapitres ont été nécessaires, nous en avons réservé plusieurs aux *Protozoaires parasites* dont l'étude a fait de grands progrès depuis quelques années.

Nous avons enrichi cette nouvelle édition de la description des *Microbes pathogènes pour les animaux*; notre manuel trouvera désormais sa place dans les mains des vétérinaires comme dans celles des médecins.

En augmentant le texte, nous avons multiplié le nombre des figures; pour la première fois, nous donnons des gravures coloriées représentant les cultures des principaux microbes; cette partie de notre tâche nous a été facilitée par le concours dévoué de MM. Baillière, nos éditeurs, auxquels nous sommes heureux de témoigner notre reconnaissance.

A. BESSON.

Paris, 20 août 1901.

ERRATA

P. 60. Ligne 14, *au lieu de:* le fil de gélatine, *lire:* le fil de platine.

P. 93. Ligne 9, — (V. chap. XXI), *lire:* (V. 2e partie, chap. XXI).

P. 100. Ligne 1, — Sulfoindigonate de soude, *lire:* Sulfoindigotate de soude.

P. 210. Ligne 23 (Mélange sublimé Flemming), *au lieu de :* Sol. d'ac. chromique à 1 p. 10, *lire :* Sol. d'ac. chromique à 1 p. 100.

P. 320. Ligne 16, *au lieu de :* le Streptocoque est, *lire :* le Streptocoque de la mammite est.

P. 321. Ligne 1, *au lieu de :* Taval, *lire :* Tavel.

P. 402. Légende de la figure 198, *au lieu de :* Thionine phéniquée, *lire :* Bleu phéniqué.

P. 560. Ligne 23, *au lieu de:* de couleur d'aniline, *lire:* des couleurs basiques d'aniline.

P. 631. Ligne 1, *au lieu de:* Hœmogregarina, *lire:* Hæmogregarina.

P. 633. Ligne 19, — Hœmogregarina, *lire :* Hæmogregarina.

PRÉCIS

DE

TECHNIQUE MICROBIOLOGIQUE

PREMIÈRE PARTIE
TECHNIQUE GÉNÉRALE

CHAPITRE PREMIER
STÉRILISATION

Stériliser, c'est détruire les germes vivants.

Les microbes sont répandus dans les milieux extérieurs (sol, air, eau) et souillent tous les objets qui nous entourent.

L'étude des espèces microbiennes implique l'obtention de cultures pures, débarrassées de tout élément étranger; de cette nécessité découle l'obligation de *stériliser*, de priver de germes, les vases, les milieux nutritifs, les instruments.

De plus, quand ces objets sont *stérilisés*, sont *purs*, il faut les préserver des poussières atmosphériques et, en général, de tout contact susceptible de leur apporter à nouveau des germes. Pour cela, quand il s'agit de flacons, ballons, tubes, à ouverture étroite, on les bouche, avant de les stériliser, avec un tampon d'ouate modérément serré; au contraire les verres, cristallisoirs, boîtes, sont couverts ou enveloppés de papier.

1° **Fermeture à l'ouate.** — Prendre un fragment d'ouate non hydrophile, le replier sur lui-même, présenter le sommet du tampon ainsi obtenu à l'orifice du vase à boucher, l'y faire pénétrer par un mouvement de vrille en serrant légèrement, sur une hauteur de 2 à 3 centimètres : la partie

supérieure du bouchon doit dépasser un peu le bord de l'orifice. Ne pas craindre de faire les tampons un peu gros.



Fig. 1. — Verre couvert de papier.

2° **Fermeture au papier**. — Se servir de papier filtre ordinaire ou de papier à affiches.

a. Les cristallisoirs, boîtes, etc., sont enveloppés entièrement dans plusieurs doubles de papier.

b. Pour les verres à expériences, on se contente d'en couvrir l'ouverture avec de larges morceaux de papier mis en double, dont les bords sont repliés et viennent envelopper le corps du verre. En repliant le papier, éviter de le déchirer sur les bords du verre, ce qui rendrait l'occlusion illusoire.

Il existe de nombreux procédés de stérilisation ; en technique bactériologique, on s'adresse de préférence aux procédés physiques : chaleur, filtration ; l'emploi des antiseptiques n'est qu'exceptionnel. Nous décrirons les procédés les plus fréquemment utilisés.

Article I. — STÉRILISATION PAR LA CHALEUR SÈCHE.

A. **Stérilisation au rouge**. — Le procédé le plus simple de stérilisation consiste à porter les instruments à la température du rouge, dans la flamme d'une lampe à alcool ou d'un bec de Bunsen.

Ce procédé, en raison de la détérioration qu'il entraîne, n'est applicable qu'à un nombre restreint d'instruments : fils de platine, palettes de fer ou de nickel, couteaux dans certains cas, etc.

Avoir soin de laisser refroidir l'objet porté au rouge avant de le mettre en contact avec le produit à ensemencer.

B. **Flambage**. — 1° Le flambage peut être pratiqué en passant rapidement l'objet à stériliser dans une flamme chaude, il n'est alors applicable qu'aux objets de petites dimensions et à surface polie, dépourvue d'anfractuosités pouvant protéger les germes à détruire (pipettes et baguettes de verre par exemple).

2° D'ordinaire, on utilise le *four à flamber*.

Le FOUR PASTEUR (fig. 2) est en usage dans tous les laboratoires; on y stérilise les objets de verrerie, la porcelaine, les instruments d'acier à manche de nickel, etc. Les composés organiques, sauf l'ouate et le papier, ne sont pas susceptibles d'être stérilisés par ce procédé.

Pour que la stérilisation soit complète, il faut que les objets soient portés et maintenus trente minutes à une température d'environ 180°.

A cette température, l'ouate et le papier roussissent légèrement, prennent une coloration brun clair.

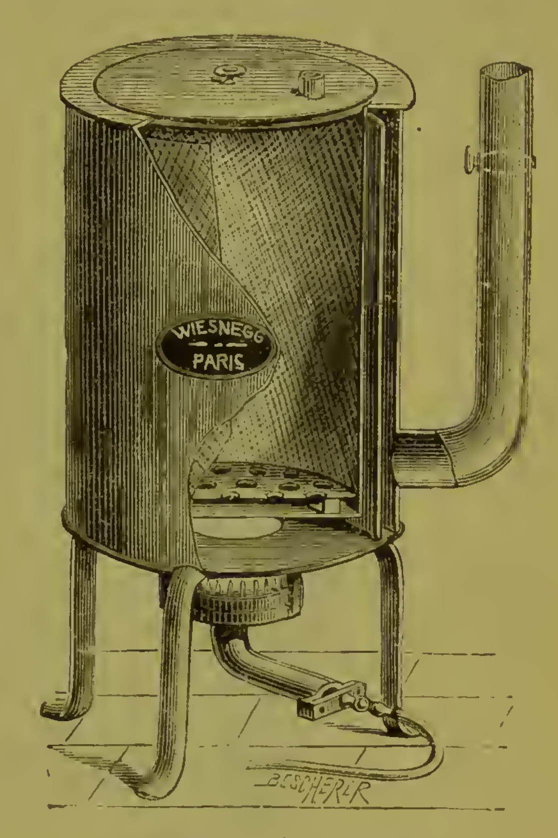


Fig. 2. — Four Pasteur.

Description. — Le four Pasteur est constitué par un cylindre de tôle à doubles parois au-dessous duquel est placé un fort brûleur à gaz. Dans la cavité limitée par la paroi interne se trouve un panier métallique destiné à recevoir les objets à stériliser. Un couvercle, avec tubulure recevant par l'intermédiaire d'un bouchon perforé un thermomètre à mercure gradué jusqu'à + 200°, s'adapte à la partie supérieure du cylindre.

Le brûleur à gaz étant allumé, l'air chaud lèche le fond de l'étuve, circule dans la double paroi et s'échappe par un tuyau de fumée (fig. 2).

Fonctionnement. — *a.* Les objets à stériliser ont été préalablement lavés avec soin et rincés à grande eau pour les débarrasser de toute matière organique qui se carboniserait pendant l'opération. Ils sont ensuite séchés complètement, sans quoi ils casseraient pendant le flambage. Ils sont enfin bouchés au papier ou à l'ouate comme il a été dit plus haut.

b. Les objets ainsi préparés sont disposés dans le panier de toile métallique; il faut avoir soin que l'ouate et le papier ne touchent pas au fond, ni aux parois du four, sous peine de se carboniser. L'ouate et le papier doivent brunir légèrement, mais en aucun cas on ne peut faire usage d'instruments dont le papier ou l'ouate auraient été carbonisés.

En se décomposant par la chaleur, le papier et l'ouate produisent un goudron riche en matières antiseptiques dont la présence gêne le développement des germes; quand la carbonisation se produit, les objets de verrerie doivent être lavés à l'alcool, puis à l'eau, séchés et stérilisés de nouveau.

Nous recommandons de disposer au fond du four une ou deux briques réfractaires; on empêche ainsi le contact immédiat des objets avec le métal surchauffé, ce qui prévient la carbonisation du papier et supprime une cause importante de casse pendant la chauffe.

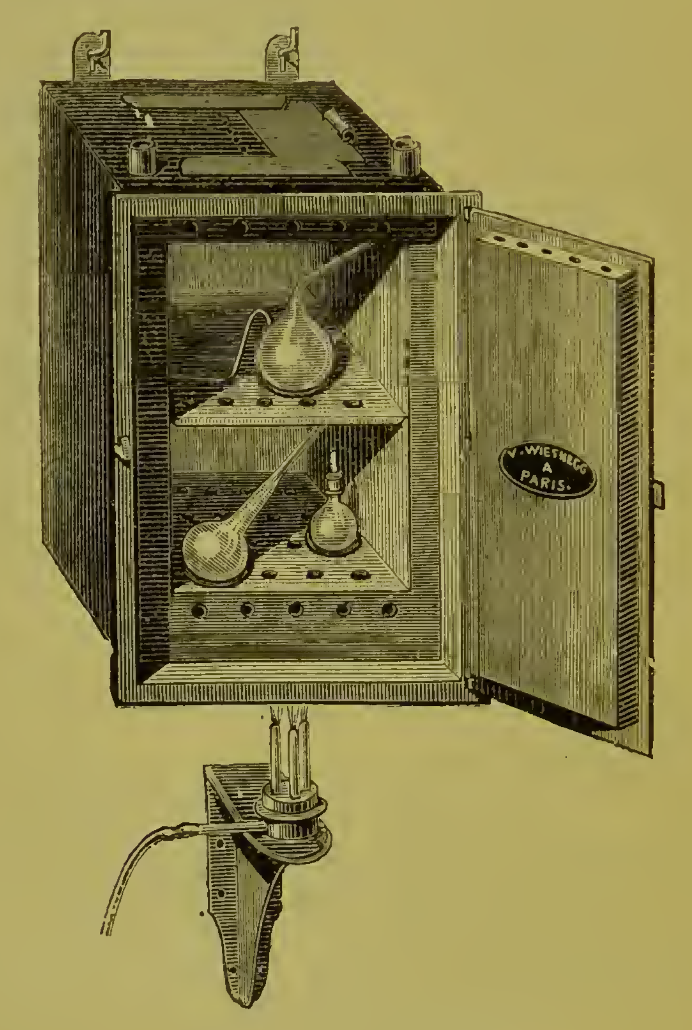


Fig. 3. — Four de Chantemesse.

c. Placer le couvercle et enfoncer le thermomètre profondément dans le four.

d. Allumer en ayant soin d'approcher du brûleur une allumette enflammée avant d'ouvrir le robinet du gaz (si l'on ouvrait d'abord le robinet, le gaz se mélangerait à l'air dans la double paroi de

l'appareil et il se produirait une explosion au moment où l'on approche l'allumette).

e. Chauffer lentement, surtout si les objets à stériliser sont en verre épais (verres à pied, cristallisoirs, etc.), ces objets cassant facilement par une élévation brusque de température.

Quand la température de 175° à 180° est atteinte, fermer peu à peu le robinet du gaz de façon à mettre le brûleur en veilleuse et maintenir la température pendant environ une demi-heure.

On parvient facilement avec un peu d'habitude à régler par tâtonnements la température du four; il arrive souvent qu'en voulant baisser la flamme, on l'éteint à chaque coup : on évite ce petit ennui en ne tournant pas avec la main la clef du robinet du gaz, mais en la faisant avancer peu à peu à l'aide de petits coups donnés avec un corps pesant, un marteau ou une clef d'autoclave par exemple; on peut ainsi régler la flamme avec une grande précision.

L'ouate et le papier brunissant légèrement à la température de stérilisation, on peut, avec de l'habitude, se passer du thermomètre pour conduire l'opération. On règle la marche d'après la couleur du papier : dès que celui-ci prend une teinte brune, on sait que la température de 180° est atteinte et on baisse la flamme.

f. L'opération terminée, on éteint le gaz. On ne retire la verrerie du four qu'après refroidissement complet, pour éviter la casse qui résulterait de l'exposition brusque des objets chauds à l'air froid.

Le stérilisateur à air chaud de Chantemesse ne diffère du four Pasteur que par la forme (fig. 3). Il est rectangulaire, disposé en forme d'armoire, et renferme des tablettes intérieures mobiles permettant d'y placer les objets sur plusieurs étages. Le maniement de cet appareil est identique à celui du four Pasteur.

Article II. — STÉRILISATION PAR LA CHALEUR HUMIDE.

Il existe trois procédés de stérilisation par la chaleur humide : 1° chauffage dans l'eau ou la vapeur à 100°; 2° chauffage dans la vapeur sous pression; 3° chauffage discontinu à basse température.

§ 1er. — CHAUFFAGE A 100°.

L'ébullition ou l'exposition à la vapeur à 100° ne suffisent pas, même quand leur action est prolongée, pour tuer tous les microbes.

La dessiccation, surtout après inclusion dans des matières albuminoïdes, augmente beaucoup la résistance des microbes et permet à certains d'entre eux de supporter la température de l'eau bouillante. Les *spores*, formes de résistance, tolèrent également, dans la plupart des cas, une température de 100° pendant plusieurs minutes.

Aussi, en France, n'emploie-t-on qu'exceptionnellement ce mode de stérilisation; on l'utilise cependant pour stériliser les seringues destinées aux inoculations : en faisant bouillir l'appareil pendant quinze à vingt minutes, on obtient une asepsie généralement suffisante.

En Allemagne, on emploie beaucoup le *stérilisateur de Koch* par la vapeur à 100° (fig. 4), mais avec cet appareil une stérilisation unique ne suffit pas; il faut répéter au moins deux fois et même trois fois l'opération, à vingt-quatre heures d'intervalle, c'est la méthode du *chauffage discontinu* (Tyndall).

Tyndall observe qu'on ne peut pas stériliser une infusion de foin par une ébullition : cette infusion contient des bacilles et des spores (*B. subtilis*) : à 100° les bacilles sont détruits, tandis que les spores résistent. Mais soumettant le lendemain, puis le surlendemain, la même infusion à de nouvelles ébullitions, Tyndall la trouve stérile après le troisième chauffage. Tel est le principe du chauffage discontinu. Les spores, disait Tyndall, non détruites par la première ébullition ont germé dans l'intervalle; elles ont donné des bacilles qui sont détruits par la seconde opération; quelques spores ont-elles encore échappé, elles auront germé lors de la troisième ébullition et la stérilisation sera définitive. A cette explication, on préfère aujourd'hui celle qui consiste à admettre une atténuation progressive de la résistance des microbes sous l'influence de l'action répétée de la chaleur.

Stérilisateur de Koch. — Il est constitué par une marmite cylindrique en cuivre munie d'un niveau d'eau et prolongée par un cylindre métallique muni de plateaux mobiles destinés à supporter les objets à stériliser. La partie supérieure est fermée par un couvercle portant une tubulure pour le passage d'un thermomètre.

Pour faciliter la stérilisation des milieux de culture à l'aide de cet appareil, ces milieux doivent être contenus dans des récipients préalablement flambés.

Fonctionnement. — 1° Verser de l'eau dans la chaudière jusqu'au trait marqué sur le tube à niveau. Adapter le cylindre sur la chaudière, y disposer les objets à stériliser. Placer le couvercle et le thermomètre.

2° Allumer le brûleur à gaz sous la chaudière; noter le moment où la vapeur s'échappe autour du couvercle (le thermomètre marquant 98° à 100°); à partir de ce moment, prolonger l'opération pendant trente minutes.

3° Recommencer la stérilisation le lendemain et le troisième jour.

Quand on sort les objets du stérilisateur, les bouchons d'ouate sont fréquemment mouillés par l'eau de condensation; il faut

alors porter les objets pendant quelques heures dans une étuve sèche, car le bouchon d'ouate n'est un obstacle à la pénétration

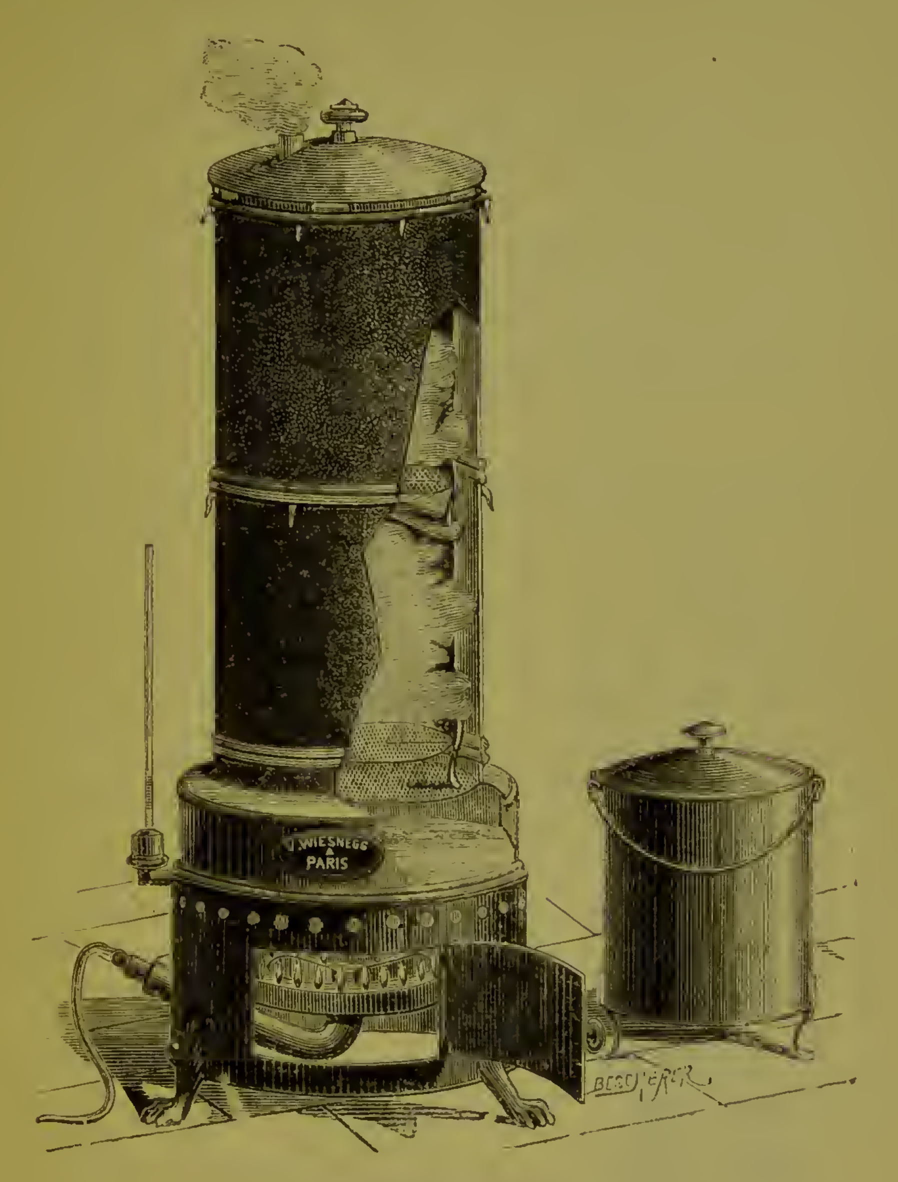


Fig. 4. — Stérilisateur à vapeur de Koch.

des germes extérieurs qu'à la condition d'être absolument privé d'humidité.

Il existe plusieurs modifications de l'appareil primitif de Koch. Un modèle construit par Wiesnegg possède une double paroi où circule la vapeur avant de s'échapper : on obtient ainsi une constance absolue de la température à l'intérieur du stérilisateur ; il est muni en outre d'une chaudière à niveau constant : le maniement est le même que pour l'appareil de Koch.

§ 2. — CHAUFFAGE DANS LA VAPEUR SOUS PRESSION.

La stérilisation par la vapeur sous pression est couramment employée dans les laboratoires français. On utilise ce procédé pour stériliser l'eau, les milieux de culture, les seringues, objets en caoutchouc, etc.; les instruments d'acier perdent de leur tranchant par ce traitement.

Un séjour de vingt minutes dans la vapeur à 115° suffit dans la majorité des cas pour obtenir une stérilisation complète; cependant, pour quelques substances telles que les pommes de terre, par exemple, il est nécessaire d'atteindre la température de 120°.

Nous décrirons deux appareils de stérilisation par la vapeur sous pression.

1° **Autoclave Chamberland.** — L'autoclave est constitué par une chaudière cylindrique en cuivre dont les bords dressés s'adaptent, par l'intermédiaire d'une rondelle de caoutchouc, aux bords également dressés d'un couvercle en bronze. L'adhérence entre la chaudière et le couvercle est assurée par des boulons. Le couvercle porte une soupape de sûreté, un robinet de vapeur et un manomètre indiquant la pression en atmosphères et la température en degrés centigrades. A l'intérieur, un panier en toile de cuivre repose, par des pieds hauts de 5 à 6 centimètres, sur le fond de la chaudière. La chaudière elle-même est reçue dans un fourneau cylindrique en tôle ou en cuivre qui contient une ou deux couronnes de becs de gaz.

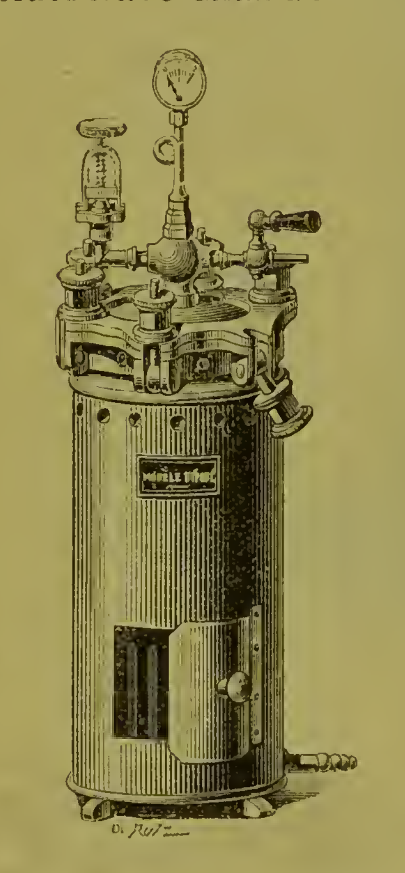


Fig. 5. — Autoclave Chamberland.

Fonctionnement. — *a.* Verser dans la chaudière une quantité d'eau (distillée de préférence pour éviter les encrassements) suffisante pour que le niveau arrive un peu au-dessous du fond du panier métallique. Disposer dans le panier les objets à stériliser.

b. Placer la rondelle de caoutchouc, poser le couvercle, relever et serrer les écrous. Le serrage doit s'opérer de préférence avec les mains; si on utilise pour le pratiquer la clef qui accompagne l'autoclave, on serre trop énergiquement, écrase la rondelle de caoutchouc et la met rapidement hors d'usage (1).

c. Ouvrir le robinet de vapeur du couvercle.

d. Allumer le gaz : présenter l'allumette au brûleur avant d'ouvrir le robinet de gaz, n'allumer qu'une seule des deux couronnes. Veiller à ce que les becs de gaz ne brûlent pas en dedans; si cela arrivait, éteindre et rallumer à nouveau.

e. L'eau étant portée à l'ébullition, la vapeur s'échappe par le robinet laissé ouvert; attendre quelques minutes jusqu'à ce que le jet de vapeur soit fort et sorte en sifflant.

Cette manœuvre a pour but de laisser échapper l'air contenu dans l'autoclave et dont la présence fausserait les indications du manomètre. Quoi qu'on fasse, il reste toujours, surtout avec les grands modèles, un peu d'air dans l'appareil; on pourrait expulser plus efficacement cet air en ouvrant et fermant plusieurs fois de suite le robinet, c'est-à-dire en opérant des *décompressions*, mais ce procédé est inapplicable à la stérilisation des liquides : sous l'influence des décompressions brusques, les liquides des flacons entrent en ébullition, chassent les bouchons d'ouate et se répandent dans l'autoclave.

Le robinet de vapeur est alors fermé; on voit l'aiguille du manomètre monter rapidement; quand elle a atteint la température désirée — d'ordinaire 115° — on règle le gaz par tâtonnements, de façon à maintenir la température à ce degré pendant vingt minutes.

f. La stérilisation terminée, on éteint le gaz L'aiguille du manomètre ne tarde pas à rétrograder; attendre qu'elle soit revenue au zéro du cadran (100°), puis ouvrir le robinet de vapeur. Dès que la vapeur s'est échappée, desserrer les boulons et enlever le couvercle; sortir les objets et les porter à l'étuve sèche si l'ouate des bouchons est humide.

Il ne faut pas ouvrir le robinet avant que l'aiguille du manomètre soit revenue au zéro, pour éviter la projection du liquide des flacons dans l'autoclave sous l'influence de la décompression. Ne jamais desserrer les boulons avant d'avoir ouvert le robinet de vapeur, pour ne pas être brûlé par la vapeur qui s'échapperait lorsqu'on soulèverait le couvercle. Enfin, il ne faut pas attendre que l'appareil soit complètement refroidi pour enlever le couvercle, sans quoi la rondelle de caoutchouc adhérerait et rendrait l'ouverture difficile.

(1) Dans l'intervalle des séances de stérilisation, il est bon de ne pas laisser la rondelle de caoutchouc sous le couvercle afin qu'elle ne s'écrase point; mieux vaut la suspendre contre un mur. En tous cas, quand l'appareil est au repos, ne jamais serrer les boulons.

On peut, avec l'autoclave, stériliser à 100°; il suffit pour cela de disposer l'appareil comme nous l'avons dit en *a*, *b*, *c*, *d*, puis de laisser le robinet de vapeur ouvert pendant toute la durée de l'opération (trente minutes) en réglant le brûleur de façon que l'aiguille ne quitte pas le zéro du cadran.

Ne jamais prolonger l'opération plus de quarante minutes à une heure, sans quoi la chaudière se trouverait à sec. Bien veiller à ce que la chaudière contienne toujours une quantité d'eau suffisante.

Fig. 6. — Autoclave de Ducretet et Lejeune.

Parmi les nombreux modèles d'autoclaves que l'on trouve dans le commerce, nous signalerons celui de Ducretet et Lejeune (fig. 6). Le principe et le maniement de cet appareil sont les mêmes que pour l'autoclave de Chamberland. Mais la forme haute de l'appareil permet d'y stériliser les instruments allongés : il peut en particulier, grâce à un dispositif spécial de plateaux (SU) recevoir trente-quatre bougies Chamberland. Sa robustesse lui permet de résister à des pressions de trois à quatre atmosphères et d'être employé pour la stérilisation par l'acide carbonique comprimé (D'Arsonval) ; dans ce cas, on relie le robinet R au récipient de gaz comprimé en interposant un détendeur ne permettant pas à la pression dans l'autoclave de dépasser les limites imposées.

2° **Stérilisateur Vaillard et Besson.** — Dans les grands laboratoires où l'on consomme beaucoup de milieux de culture, et principalement pour la préparation des toxines destinées à l'immunisation des chevaux pour la sérothérapie, on est obligé d'avoir recours à des appareils de plus grandes dimensions que l'autoclave Chamberland. Dans ce cas, l'étuve de Vaillard et Besson (1) est généralement utilisée (fig. 7).

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894.

Cette étuve est constituée par une grande chaudière cylindrique à double parois (dimensions : haut. 0m,80, diam. 0m,75 ; ou haut. 0m,75, diam. 0m,45) ; dans l'espace central S on dispose sur des étagères les

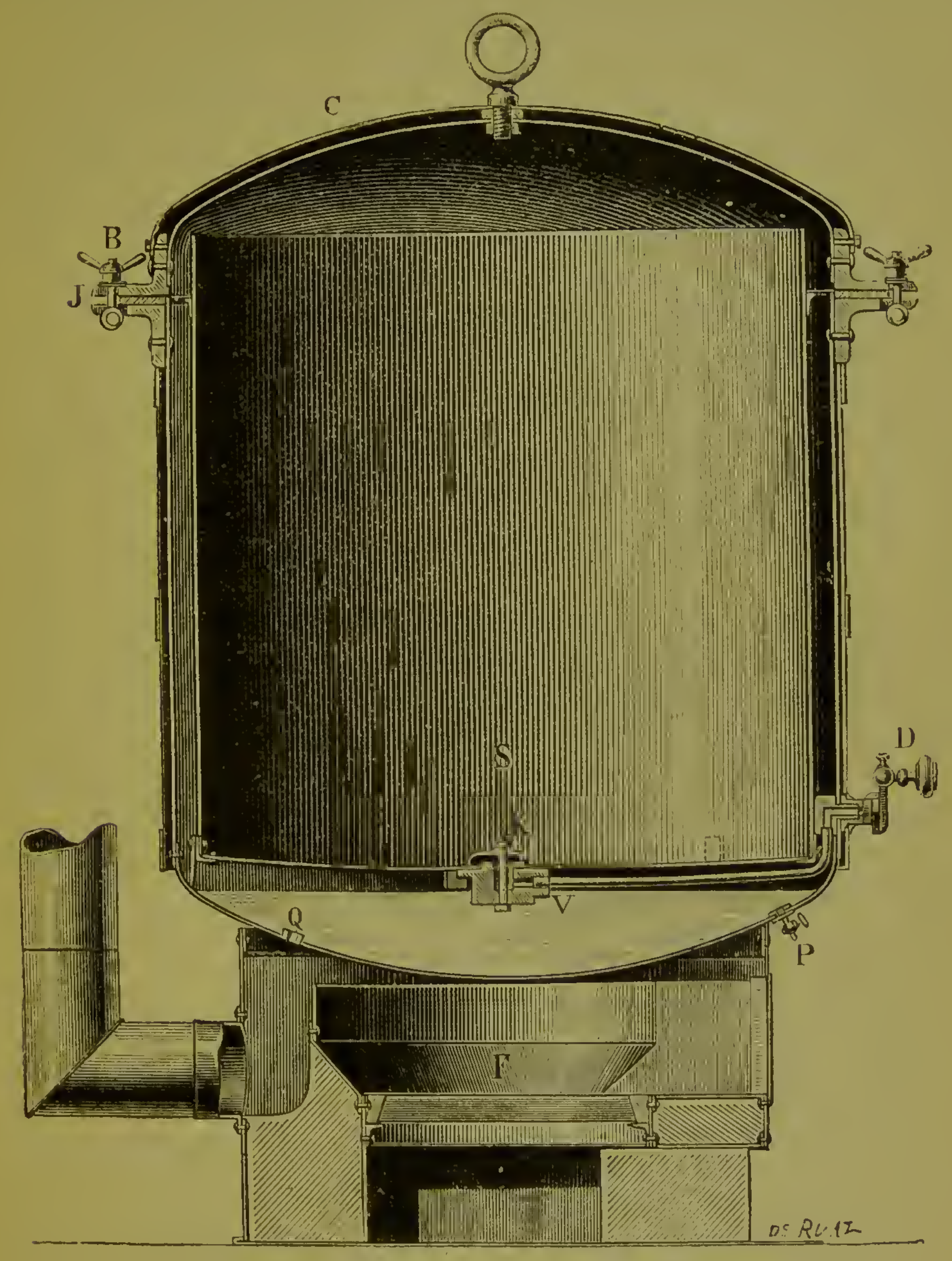


Fig. 7. — Appareil à stérilisation de Vaillard et Besson.

objets à stériliser ; la vapeur produite à la partie inférieure, dans le double fond V, passe entre les deux parois, arrive au contact des objets en traversant l'espace S de haut en bas et s'échappe par un clapet D qui règle son écoulement de telle sorte que la pression et

par conséquent la température intérieures s'élèvent progressivement. Quand la température de 115° est atteinte, le fonctionnement du clapet permet automatiquement l'issue de la vapeur et empêche la pression de s'élever davantage. La chaudière est munie, en outre d'un robinet de niveau, d'un manomètre, d'un robinet à soupape et d'un entonnoir latéral par lequel on verse l'eau d'alimentation. La stérilisation a lieu dans un courant de vapeur, condition qui entraîne l'expulsion totale de l'air sans qu'il soit pour cela besoin de recourir à des décompressions sur les inconvénients desquelles nous avons insisté.

Fonctionnement. — *a*. Disposer les objets à stériliser dans le cylindre intérieur de l'étuve. Mettre en place le couvercle et le fixer solidement au moyen des écrous.

b. Le robinet de l'entonnoir latéral étant ouvert, ainsi que le robinet de niveau (P), verser de l'eau dans la chaudière jusqu'à écoulement par le robinet de niveau. Fermer les deux robinets. Soulever le clapet D.

c. Allumer le foyer (ce foyer est ordinairement alimenté au charbon).

d. L'eau entre en ébullition, la vapeur s'élève dans la double paroi, arrive dans la chambre de stérilisation et s'échappe par le tube VD. Quand le jet de vapeur est vigoureux, on abaisse le clapet D. La pression et la température montent dans l'intérieur de l'étuve, on en suit la marche sur le manomètre. A mesure que la pression s'élève, l'échappement de la vapeur se fait plus vivement sous le clapet; dès que la température atteint 115°, la vapeur s'écoule davantage et l'aiguille reste stationnaire; en aucun cas la pression ne peut dépasser le degré pour lequel est établi le clapet.

Le temps nécessaire à la stérilisation est compté à partir du moment où l'aiguille du manomètre indique 115° ; prolonger alors l'opération pendant vingt minutes en soutenant le feu pour que l'aiguille du manomètre ne redescende pas.

e. La stérilisation terminée, retirer le feu, laisser refroidir l'étuve jusqu'au moment où l'aiguille du manomètre est au zéro; ouvrir le robinet supérieur R, puis enlever le couvercle de l'étuve.

Cet appareil permet aussi la stérilisation à 100°; pour cela on exécute les trois premiers temps comme précédemment, mais on n'abaisse pas le clapet D ; la vapeur s'écoule en jet vigoureux pendant toute la durée de l'opération. On prolonge la stérilisation pendant trente minutes.

Une disposition spéciale du clapet permet également d'opérer à toutes les températures comprises entre 100° et 115°: on règle

l'étuve à la température désirée, en éloignant plus ou moins la boule de la position perpendiculaire au clapet : plus la boule est distante de cette position, moins la température s'élèvera au-dessus de 100°.

§ 3. — CHAUFFAGE DISCONTINU A BASSES TEMPÉRATURES.

Certains milieux de culture riches en albumine ne peuvent être portés à la température de l'ébullition sans s'altérer notablement et perdre leurs propriétés ; tel est le cas du sérum, par exemple.

Pasteur a montré qu'on peut alors remplacer l'action rapide d'une haute température par l'action prolongée d'une température moins élevée (+ 55° à + 60°) : c'est la *pasteurisation*. Mais dans la pratique bactériologique, il faut combiner cette méthode avec celle du chauffage discontinu de Tyndall.

Voici comment on procède :

Le liquide à stériliser est réparti dans des ballons à long col, préalablement flambés, que l'on remplit aux trois quarts et que l'on ferme à la lampe d'émailleur.

Les ballons sont ensuite disposés dans un bain-marie dont on élève progressivement la température à + 56° ou 58°. Un thermomètre plongeant dans le bain-marie permet de suivre à tout instant la marche de la température. Dès que le degré désiré est obtenu, on modère le brûleur, de manière à maintenir la température pendant une heure à ce degré. On laisse alors refroidir l'appareil sans en retirer les ballons.

On recommence l'opération tous les jours pendant une semaine entière ; après quoi, la stérilisation peut être considérée comme terminée. Avant d'utiliser les liquides stérilisés, il est prudent de les laisser séjourner deux à trois jours dans l'étuve à 37° pour s'assurer de leur pureté. Tout ballon dans lequel se produirait une culture devrait être rejeté.

Ainsi pratiquée, cette opération est très difficile : on dépasse facilement la température maximale de + 58°, les albumines se coagulent et le matériel de culture est perdu. Aussi opère-t-on d'ordinaire à l'aide d'un bain-marie spécial muni d'un régulateur avec lequel on est sûr de ne pas dépasser la température fixée.

L'appareil construit par Wiesnegg se compose d'une chaudière A, disposée sur un brûleur à gaz, munie d'un couvercle F et d'un régulateur de Roux R placé dans un appendice C (fig. 8).

Fonctionnement. — La chaudière étant emplie d'eau aux trois quarts, les ballons y sont disposés et maintenus immergés par un

disque en toile métallique. Placer le couvercle muni d'un thermomètre T. Allumer le gaz. Surveiller le thermomètre. Dès que la température désirée est atteinte, régler le régulateur de la manière indiquée plus loin (Voy. chap. IV), et à partir de ce moment l'opération peut se poursuivre d'elle-même sans surveillance.

L'appareil est réglé une fois pour toutes, et les jours suivants on

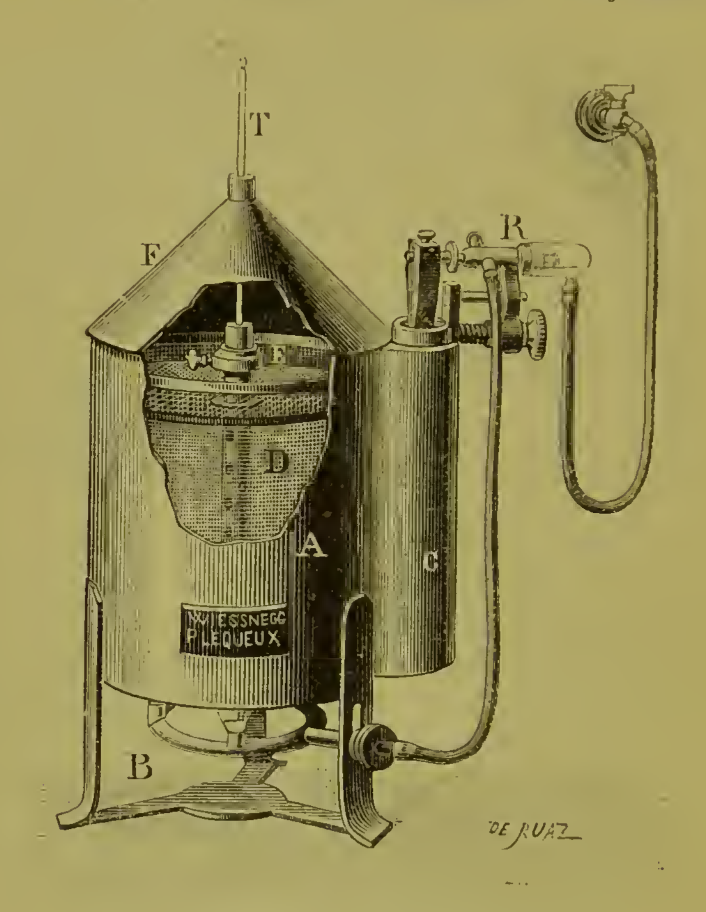


Fig. 8. — Bain-marie pour stériliser le sérum.

n'a qu'à allumer le gaz sans se préoccuper du réglage, qui se fait automatiquement. Ajouter de temps en temps de l'eau dans le bain-marie.

La première fois qu'on utilise l'appareil, il est préférable de le faire fonctionner à blanc et de le régler avant d'y placer les ballons à stériliser ; on évitera ainsi tout mécompte. On se conformera pour le reste aux règles indiquées plus haut : faire sept à huit séances de chauffe de une heure de durée chacune.

Article III. — FILTRATION.

Certains liquides ne peuvent supporter, sans altération profonde, une élévation même légère de température ; il faut alors recourir à la filtration pour les débarrasser des germes qu'ils contiennent ; pour cela on les fait passer dans des corps solides au travers de pores d'une ténuité extrême où sont retenus les germes. Pasteur, au début de ses recherches, utilisait dans ce but des plaques de plâtre ; aujourd'hui on emploie ordinairement le filtre en porcelaine poreuse de Chamberland.

Ce filtre se compose d'un tube ou *bougie* de porcelaine poreuse fermé à une de ses extrémités, ouvert à l'autre où il est muni d'une *tétine* B en porcelaine émaillée ; le liquide à filtrer traverse la bougie de dehors en dedans et s'écoule stérile par la tétine. — Cette bougie peut être utilisée de diverses manières.

A. **Filtration de l'eau**. — Dans tous les laboratoires existe une de ces bougies disposée de façon à donner de l'eau stérile (fig. 9).

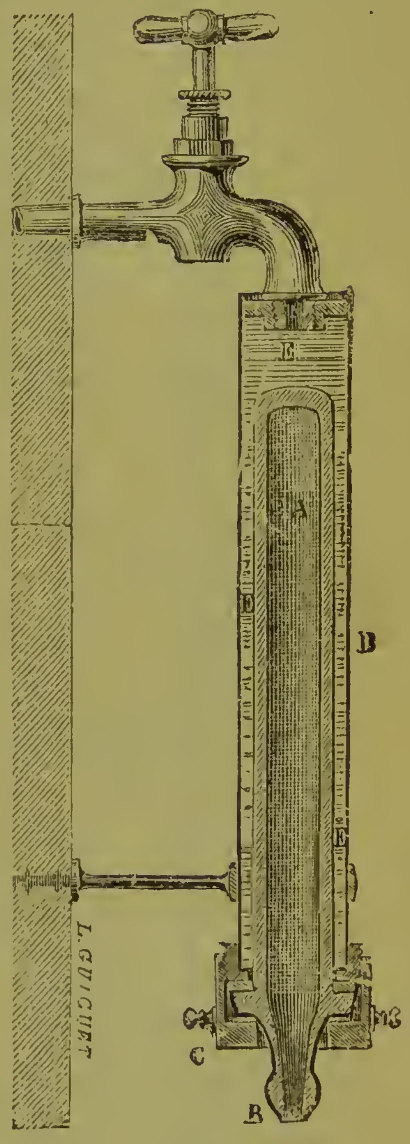


Fig. 9. — Filtre Chamberland.

Pour cela la bougie est introduite dans un cylindre métallique D dont l'orifice inférieur (par lequel a pénétré la bougie) est fermé hermétiquement au moyen d'un écrou C et d'une rondelle de caoutchouc perforés pour laisser passer la tétine ; l'orifice supérieur du cylindre est vissé sur le robinet de la conduite d'eau ; l'eau arrivant par ce robinet emplit la gaine métallique E de la bougie et s'écoule par la tétine B après avoir traversé la paroi de porcelaine poreuse en y abandonnant ses impuretés.

Remarques importantes. — 1° Avant de mettre la bougie en place, il faut s'assurer qu'elle n'est point fêlée, auquel cas elle laisserait passer les mi-

crobes et ne serait d'aucune utilité. Pour cela on plonge la bougie, jusqu'à la tétine exclusivement, dans une éprouvette pleine d'eau, et par cette tétine, au moyen d'un tube en caoutchouc muni d'une poire à insufflation, on comprime de l'air à l'intérieur de la bougie : s'il existe une fissure restée invisible à l'œil, des bulles d'air s'échappent dans l'eau et sont facilement remarquées. Toute bougie fissurée doit être rejetée (fig. 10).

2° Il faut ensuite stériliser la bougie; pour cela, après l'essai précédent, la bougie étant encore mouillée, on obture la tétine avec un tampon d'ouate

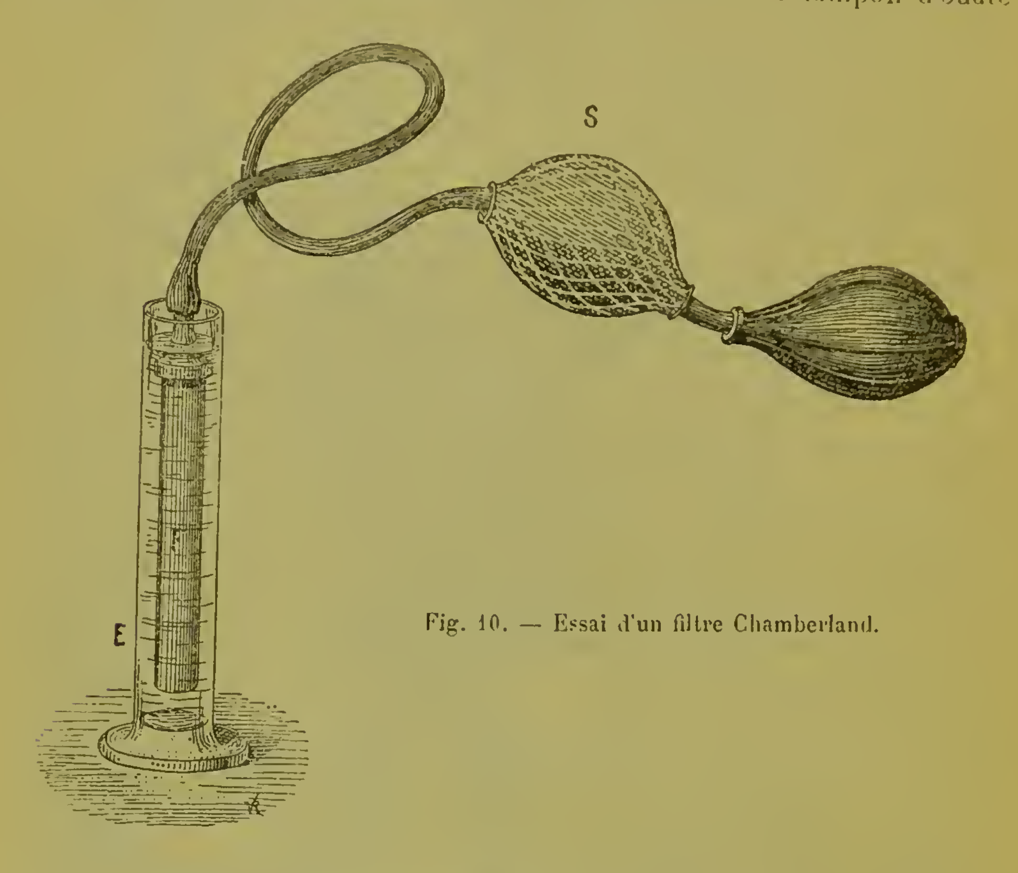


Fig. 10. — Essai d'un filtre Chamberland.

serré et on porte à l'autoclave pendant vingt minutes à 115° ou 120°. La bougie est alors montée dans sa gaine métallique, on retire le tampon d'ouate et l'appareil est prêt à fonctionner.

3° Quand on veut recueillir de l'eau stérile, l'appareil étant installé, il faut avoir soin de commencer par flamber fortement la tétine de la bougie à l'aide d'une lampe à alcool.

4° Par suite de leur fonctionnement, les bougies s'encrassent rapidement et laissent alors passer les germes ; fréquemment il faut retirer la bougie de sa gaine, la frotter énergiquement avec une brosse de chiendent sous un courant d'eau, puis la stériliser comme il a été dit plus haut;

5° Après un usage prolongé, les pores de la bougie s'obstruent et la filtration devient lente ; il faut régénérer le filtre : pour cela il existe plusieurs procédés : *a*) on porte la bougie à l'autoclave à 120° et on opère plusieurs décompressions successives ; ce procédé, excellent en ce qu'il ne compromet pas l'intégrité de la bougie, ne donne qu'une régénération relative ; *b*) après avoir bien desséché la bougie, on la porte au rouge dans la flamme d'un brûleur à gaz : on fissure fréquemment la bougie par ce pro-

cédé ; c) il vaut mieux chauffer la bougie au rouge dans un four à incinérations (quand la bougie a été régénérée par ces deux derniers procédés,

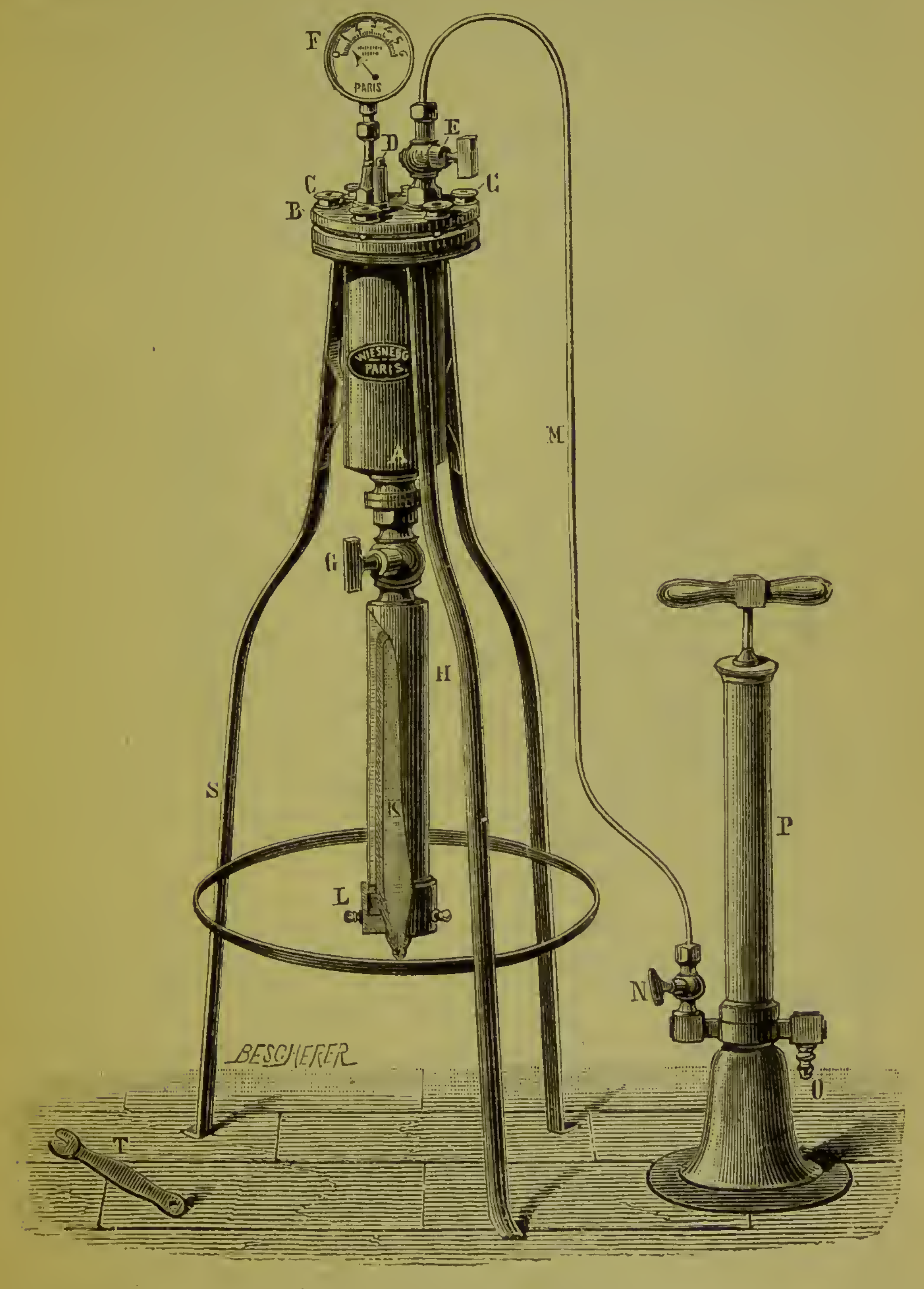


Fig. 11. — Filtre à compression.

il faut l'essayer à nouveau pour s'assurer qu'elle ne s'est point fissurée pendant l'opération) ; d) on peut enfin régénérer la bougie par l'emploi suc-

cessif du permanganate de potasse et du bisulfite de soude (procédé Guinochet) ; on fait traverser successivement la bougie par une solution de permanganate de potasse à 5 p. 1000 et une solution de bisulfite de soude à 1 p. 20 ; ce procédé est inférieur aux précédents.

6° Toutes les fois qu'une bougie a servi à filtrer une culture d'un microbe pathogène, elle doit immédiatement être portée à l'autoclave à 120°.

B. **Filtration des milieux de culture.** — On peut encore utiliser la bougie pour filtrer un milieu destiné à la culture ou séparer une culture de ses microbes.

Plusieurs dispositifs peuvent être adoptés, mais toujours la filtration doit se faire sous pression, soit qu'on comprime le liquide à stériliser, soit qu'on aspire le filtrat au sortir de la bougie.

Compression. — Le procédé le plus ancien consiste à placer le liquide à filtrer dans un réservoir en cuivre épais A, relié à une bougie, et à l'y comprimer au moyen d'une pompe de Gay-Lussac (fig. 11).

Le liquide est versé dans l'orifice D, le robinet G étant fermé. Le réservoir rempli à moitié, on visse le tampon obturateur en D et on comprime l'air au-dessus du liquide à l'aide de la pompe P. Un manomètre F indique la pression à l'intérieur de l'appareil. La pression désirée, ordinairement deux à trois atmosphères, étant atteinte, on ferme E et on ouvre progressivement G, le liquide passe en H dans un filtre Chamberland disposé comme celui décrit plus haut, traverse la bougie et sort par la tétine où on le recueille purement.



Fig. 12. — Dispositif pour recueillir le liquide filtré au sortir de la bougie.

Pour recueillir le liquide au sortir du filtre on munit la tétine d'un tube de caoutchouc de quelques centimètres de longueur terminé par un ajutage en verre. La bougie est stérilisée munie de cet appendice enveloppé dans un morceau de papier filtre. Au moment du besoin, la bougie est mise en place, puis on débarrasse l'ajutage du papier qui l'entoure et on le fait pénétrer à travers le capuchon de papier dont est couvert l'orifice du flacon stérilisé où l'on doit recueillir le liquide filtré (fig. 12). Si le flacon est bouché à l'ouate, on fait passer l'ajutage entre le bouchon d'ouate et la paroi du goulot.

Le procédé de filtration par compression nécessite un appareillage dispendieux, on le réservera au traitement des liquides visqueux.

Aspiration. — 1° Procédé de choix. — Dans la majorité des cas

on a recours à la *filtration par aspiration*; nous recommandons le procédé suivant, très simple à mettre en œuvre (fig. 13).

La tétine d'une bougie est munie d'un tube B de caoutchouc à parois épaisses (tube à vide) : l'extrémité libre de ce tube reçoit un ajutage en verre courbé à angle droit et qui s'engage dans l'un des deux trous d'un bouchon de caoutchouc. Ce bouchon (n° 7 ou 8) s'adapte sur un flacon en verre blanc A d'une contenance de 1 à 2 litres, suivant la quantité de liquide à filtrer, et à parois épaisses (ne jamais employer de matras dont les parois fragiles céderaient sous la pression atmosphérique au cours de l'opération).

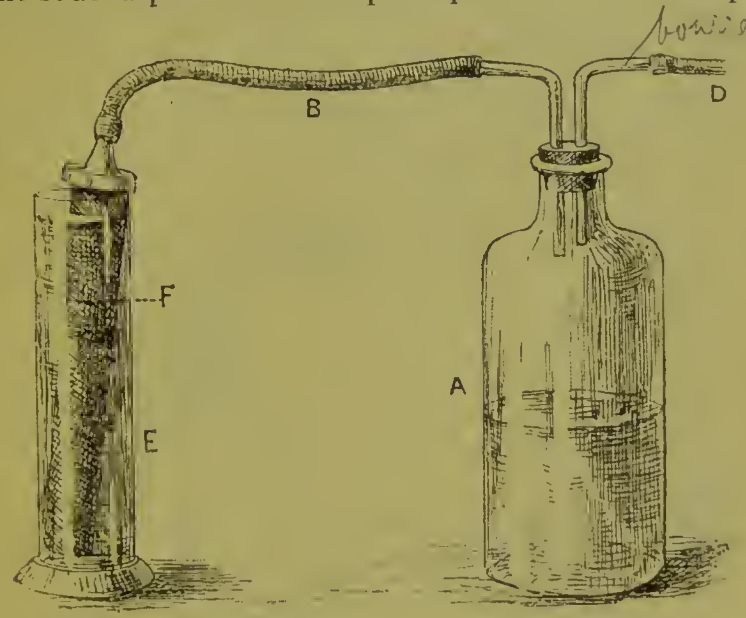


Fig. 13. — Appareil pour filtrer dans le vide.

Le second trou du bouchon reçoit un tube de verre coudé à angle droit, D, dont la branche verticale descend de quelques centimètres dans le flacon, et dont la branche horizontale porte entre deux étranglements un tampon assez serré d'ouate.

Le bouchon étant bien enfoncé dans le goulot du tube, on porte tout l'appareil dans l'autoclave; on chauffe lentement et on maintient vingt minutes la température de 120°. Après refroidissement on assure l'adhérence du bouchon et du goulot du flacon et l'appareil est prêt à fonctionner.

On place la bougie dans une éprouvette de verre E, de dimensions un peu supérieures aux siennes propres, et l'on verse dans cette éprouvette le liquide à filtrer. — On relie alors le tube D à la trompe à eau, on fait le vide, le liquide aspiré traverse la bougie et arrive dans le flacon.

L'opération terminée, on arrête la trompe à eau, on sépare l'ajutage D du tube qui le relie avec la trompe (la rentrée d'air dans le flacon se fait au travers du tampon d'ouate dont est muni l'ajutage D). On flambe ensuite le col du flacon et on substitue au bouchon qui a servi à la filtration, soit un tampon d'ouate préalablement stérilisé, soit un bouchon répartiteur disposé comme nous le dirons plus bas. Le liquide stérilisé peut se conserver indéfiniment dans le flacon à l'état de pureté.

Dans la bougie il reste toujours un peu de liquide; on peut le recueillir en séparant la tétine du tube de caoutchouc et aspirant le liquide au moyen d'une longue pipette à boule flambée (fig. 14).

Préparation du bouchon répartiteur. — Pour utiliser le filtrat obtenu, il faut pouvoir l'extraire du flacon sans qu'il soit contaminé

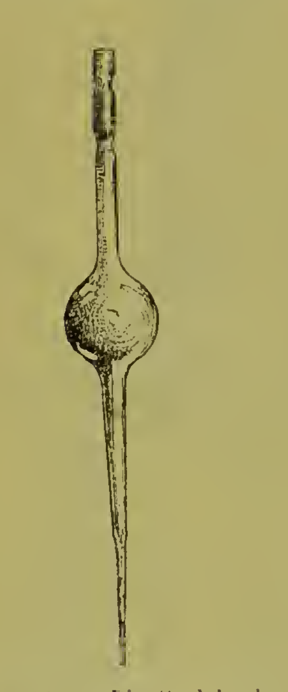




Fig. 14. — Pipette à boule.

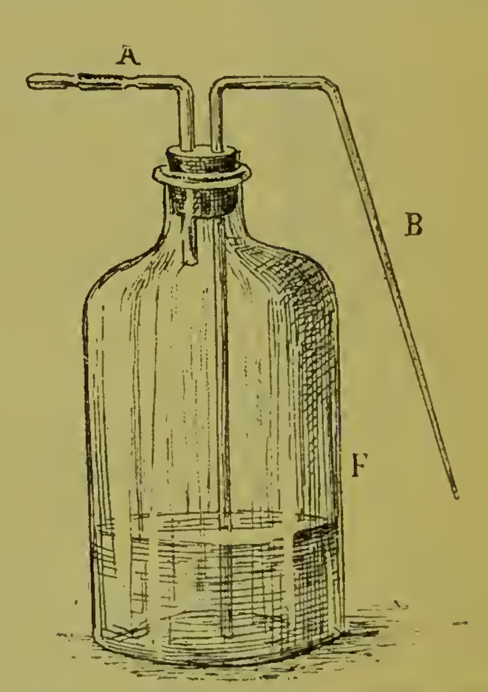


Fig. 15. — Dispositif pour la manutention des filtrats.

par les germes de l'air ; pour cela on substitue au bouchon qui a servi à la filtration un bouchon préparé comme il suit :

On prend un bouchon de caoutchouc à deux trous, de même diamètre que le précédent; un trou reçoit un tube de verre A coudé à angle droit, portant dans sa branche horizontale une bourre d'ouate entre deux étranglements, et dépassant de quelques centimètres la partie inférieure du bouchon (fig. 15). Le second trou donne passage à un autre tube B recourbé en U ouvert, dont une

branche descend jusqu'au fond du flacon et dont la deuxième, extérieure, est étirée et fermée à la flamme. Le bouchon ainsi préparé est enveloppé de papier filtre et stérilisé à l'autoclave à 120°.

Au moment de l'appliquer sur le flacon, on flambe le col de celui-ci, puis on déplie le papier qui entoure le bouchon répartiteur, et on saisit ce bouchon par sa partie supérieure avec la main gauche. La main droite restée libre débarrasse le flacon de son premier bouchon, et rapidement celui-ci est remplacé par le bouchon répartiteur. Cette opération doit se faire très vite, pour éviter la chute des poussières atmosphériques dans le flacon ; le bouchon et le tube de verre plongeant dans le flacon ne doivent avoir aucun contact avec les objets extérieurs.

Pour extraire le liquide du flacon il suffit d'adapter une poire en caoutchouc à la tubulure A, de flamber la partie effilée du tube B et d'en casser l'extrémité avec une pince flambée : quelques coups de poire amènent l'écoulement du liquide. Quand on a extrait une quantité suffisante de filtrat, on ferme le tube B à la lampe, ce qui permet de conserver le liquide restant dans le flacon à l'abri de l'air.

Au moment où l'on cesse de souffler, il se produit quelquefois, avec cet appareil, une rentrée d'air dans le flacon par le tube B; cet air peut entraîner avec lui des impuretés et souiller le liquide. On remédie à cet inconvénient par le très simple dispositif suivant.

La branche extérieure du tube B est, avant la stérilisation, coupée vers sa partie moyenne. On rejoint les deux fragments *b* et *c* au moyen d'un tube en caoutchouc rouge long de quelques centimètres et dans lequel on introduit à frottement une baguette de verre de 1 à 2 centimètres de longueur (fig. 16). A l'état de repos, la baguette obture complètement le tube en caoutchouc et s'oppose à toute communication avec l'extérieur; mais vient-on à pincer latéralement, entre le pouce et l'index, le tube de caoutchouc, il en résulte la formation d'un petit canal par lequel passe le liquide. Pour se servir de l'appareil, on opère ainsi qu'il suit :

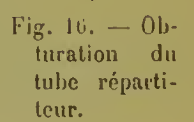


Fig. 16. — Obturation du tube répartiteur.

Le tube effilé étant flambé, son extrémité est cassée, on donne quelques coups de poire, puis on pince le tube de caoutchouc, le liquide s'écoule. Veut-on arrêter l'écoulement, on relâche d'abord le tube de caoutchouc : le liquide cesse de couler, toute communication avec l'extérieur est interrompue, alors seulement on supprime la pression, on sépare de l'appareil la poire de caoutchouc et ferme à la lampe la pointe effilée.

2° Appareil a filtration de Martin (fig. 17). — Il se compose d'un cylindre métallique B, analogue à celui que nous avons décrit page 15, et à la partie supérieure duquel on visse un entonnoir métal-

lique à robinet, D. Le liquide versé dans cet entonnoir pénètre dans la gaine métallique et traverse la bougie qui y est contenue pour arriver, par l'intermédiaire d'un tube en caoutchouc E, dans le ballon C où l'on fait le vide au moyen de la trompe à eau. Une tubulure effilée, maintenue fermée pendant l'opération, permettra

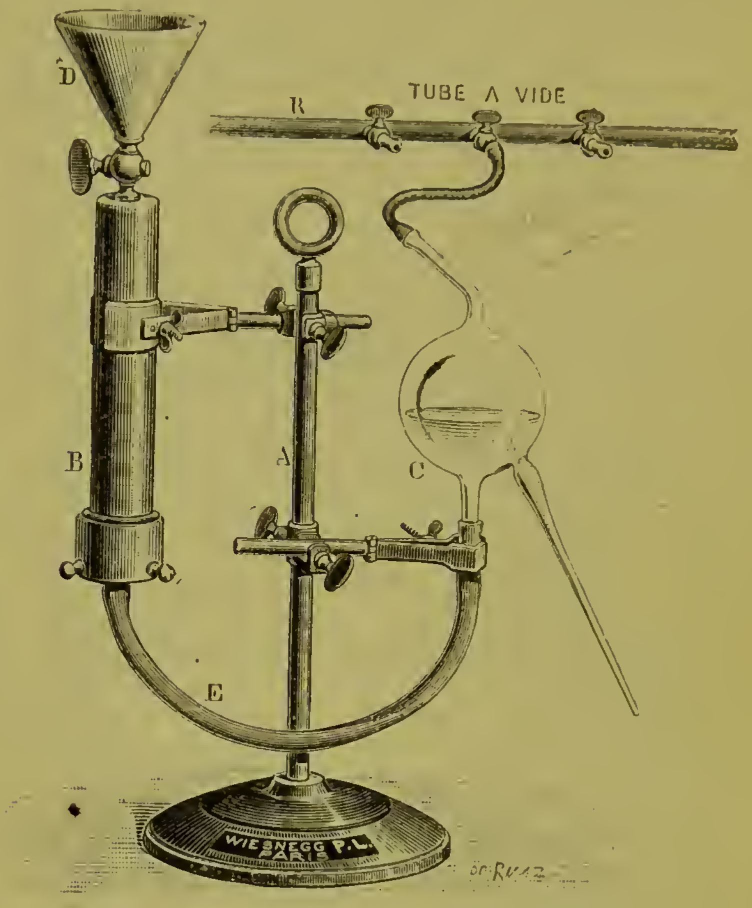


Fig. 17. — Appareil à filtration de L. Martin.

ultérieurement de répartir le liquide dans des tubes ou fioles flambés.

La tubulure supérieure du ballon C, par laquelle on fait le vide, doit être munie d'un tampon d'ouate que l'on a omis de représenter dans la figure 17. Toutes les pièces de l'appareil doivent être stérilisées avant la filtration.

Cet appareil a peu d'avantages sur le précédent; il a, en revanche. l'inconvénient de coûter fort cher.

3° Bougie de laboratoire. — Quand on veut filtrer une très petite quantité de liquide, pour l'essai d'une toxine, par exemple, on peut utiliser une petite bougie à parois minces, longue de 12 à 15 centimètres, sans embase, et dite bougie de laboratoire.

a. L'appareil peut être disposé comme le représente la figure 18; la bougie

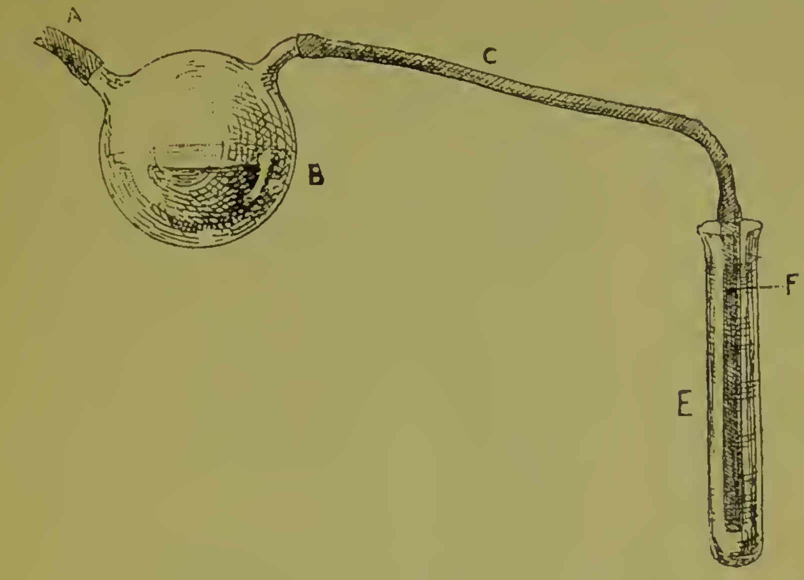


Fig. 18. — Appareil pour filtrer dans le vide.

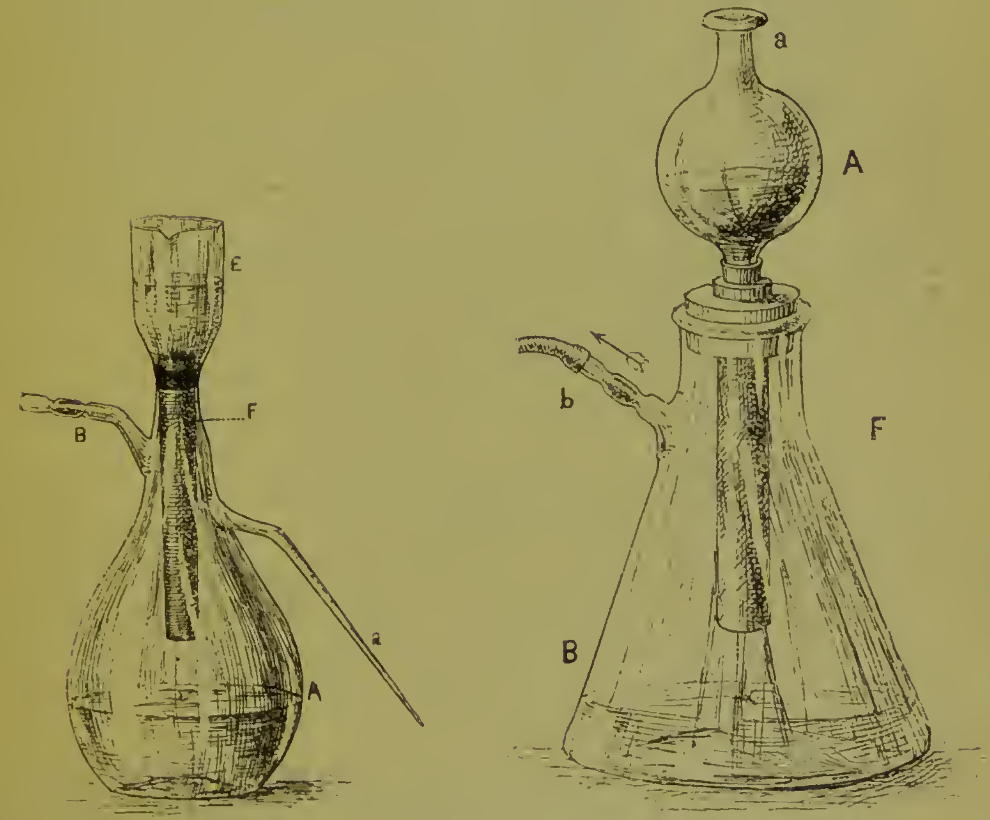


Fig. 19. — Carafe de Duclaux pour filtrer dans le vide.

Fig. 20. — Filtre de Kitasato.

plonge dans une petite éprouvette où se trouve le liquide à filtrer; un tube en caoutchouc, fortement fixé à l'aide d'une ligature élastique sur l'extré-

mité supérieure de la bougie, relie celle-ci à un petit ballon B à deux tubulures. A la tubulure A, munie d'un tampon d'ouate, on adapte soit la trompe à eau, soit une petite pompe aspirante du modèle de celle de l'appareil Potain. Stériliser l'appareil à l'autoclave avant de s'en servir.

b. La bougie peut encore être adaptée dans une carafe à trois tubulures comme dans la figure 19. Pour cela le pourtour de l'extrémité supérieure de la bougie est garni d'un peu d'ouate, puis on fait pénétrer la bougie à frottement dans la tubulure supérieure; on ferme la tubulure D et on garnit d'un tampon d'ouate la tubulure B. Après stérilisation à l'autoclave, on verse sur l'ouate, en F, un peu de cire Golaz liquéfiée, pour rendre le joint étanche. La tubulure B étant réunie à la trompe à eau, le liquide à stériliser, versé en E, traverse la bougie et se collecte dans le ballon; pour répartir le filtrat, il suffit de briser la pointe D et de souffler par B (Duclaux).

c. Le filtre de Kitasato, l'appareil de Martin pour essais, sont des modifications de la carafe de Duclaux; l'inspection des figures ci-jointes suffit à montrer leur mode de fonctionnement (fig. 20 et 21).

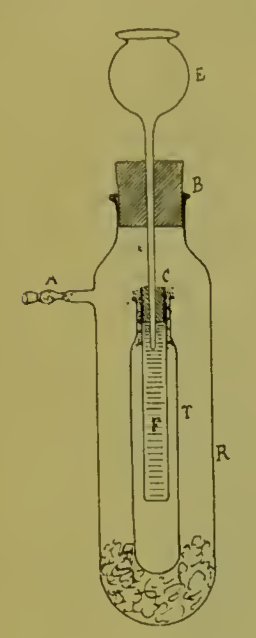


Fig. 21. — Appareil à filtration de Martin pour essais.

Règles générales. — En résumé, dans la stérilisation par filtration, deux règles capitales sont à observer :

1° *N'opérer qu'avec un filtre contrôlé, ne laissant passer aucun germe, et préalablement stérilisé.*

2° *Maintenir le liquide filtré à l'abri de toute souillure.*

ARTICLE IV. — STÉRILISATION PAR LES ANTISEPTIQUES.

Ce procédé de stérilisation est peu employé, car, non seulement il détruit les microbes contenus dans le milieu que l'on se propose de stériliser, mais il rend encore ce milieu impropre à des cultures ultérieures : la dose d'un antiseptique nécessaire pour détruire les germes dans un milieu, est toujours de beaucoup supérieure à celle qui suffit pour empêcher le développement de nouveaux germes apportés dans ce milieu.

1° On utilise les antiseptiques pour stériliser les cloches et cristallisoirs devant contenir des appareils de culture sans cependant être en contact direct avec les cultures; dans ce cas il faut avoir soin d'employer des antiseptiques fixes, n'émettant pas de vapeurs qui, en venant au contact des germes, empêcheraient leur développement.

On emploie d'ordinaire la *solution de sublimé au millième.* Cette

solution de sublimé peut être préparée avec de l'eau ordinaire, mais il faut alors ajouter à l'eau une petite quantité d'un des acides tartrique, acétique ou chlorhydrique, pour que le sublimé ne soit pas précipité par les sels en solution dans l'eau.

De plus, l'addition d'un acide à la solution de sublimé augmente beaucoup son pouvoir antiseptique et empêche le sel de mercure d'être précipité au contact des liquides organiques, ordinairement de réaction alcaline.

Furbringer conseille la solution suivante :

Eau	1 000 grammes.
Chlorure mercurique	1 gramme.
Acide acétique cristallisable	0gr,50

Il faut donner la préférence à la formule de Laplace, beaucoup plus active :

Eau	1 000 grammes.
Chlorure mercurique	1 gramme.
Acide chlorhydrique	5 grammes.

Cette solution sera couramment employée pour le lavage des mains, des cloches, etc. En avoir plusieurs litres préparés d'avance.

Nous avons à peu près abandonné le sublimé pour adopter l'*oxycyanure de mercure* en solution au millième. L'oxycyanure, antiseptique énergique, n'est pas caustique, il ne précipite pas les albuminoïdes, enfin, il n'attaque pas les objets métalliques. Il peut être utilisé pour le lavage des mains, des vases, l'antisepsie des instruments métalliques au cours des vivisections, etc.

2° Les solutions de sublimé ou d'oxycyanure de mercure sont utilisées pour stériliser la surface cutanée quand, sur le vivant, on veut faire des prélèvements de pus, de sang, etc. (Voy. chap. XI). Il faut alors avoir soin, la stérilisation terminée, de débarrasser le tégument de toute trace de l'antiseptique, au moyen de lavages à l'alcool, avant de faire le prélèvement, sans quoi les résultats des cultures seraient négatifs.

3° On utilise encore les antiseptiques quand on se propose d'empêcher la pullulation des germes dans un liquide filtré et ne devant plus servir de milieu de culture : on ajoute alors une petite quantité d'un antiseptique dépourvu d'action chimique sur les éléments que contient le liquide, par exemple, de l'acide thymique, du camphre.

4° Enfin, on stérilise quelquefois à l'aide d'un antiseptique une culture où l'on veut étudier les produits de sécrétion des microbes.

On emploie dans ce cas des antiseptiques volatils, tels que chloroforme, essence de moutarde, toluol, etc., dont on pourra ensuite facilement débarrasser le liquide par évaporation.

CHAPITRE II

MILIEUX DE CULTURE

Les substances nécessaires à la vie des microorganismes peuvent être fournies par des macérations, des bouillons de tissus animaux, des infusions végétales, ou enfin des solutions salines additionnées d'un hydrocarbure. Les milieux de culture peuvent être solides ou liquides.

Les microbes, comme toutes les cellules vivantes, sont constitués par des matières organiques azotées et non azotées et par des sels minéraux.

Il faudra donc leur fournir ces trois catégories de substances. De plus, toute cellule respire ; les microbes ont besoin d'oxygène.

Mais, tandis que certains microbes, les *aérobies*, sont susceptibles, comme les êtres supérieurs, d'utiliser l'oxygène gazeux tel qu'il se trouve dans l'air, les autres, ou *anaérobies*, ne peuvent se développer au contact de l'oxygène libre et empruntent ce corps à une de ses combinaisons qu'ils décomposent à mesure de leurs besoins (Pasteur).

A ces deux catégories de microbes correspondent des modes de culture fort différents ; les aérobies doivent être cultivés dans des vases permettant le libre accès de l'air; les anaérobies, au contraire, ne se développent que si on les préserve du contact de l'air, en les cultivant, soit dans le vide, soit en présence d'un gaz inerte.

Quoi qu'il en soit, les milieux de culture sont les mêmes pour ces deux sortes de microorganismes et doivent toujours contenir des matières azotées, des éléments ternaires et des sels. Plusieurs microbes sont susceptibles de décomposer les combinaisons minérales de l'azote (azotates, etc.) et de transformer l'azote de ces sels en azote organique : dans un certain nombre de cas, on pourra cultiver les microbes dans des milieux purement minéraux auxquels on aura eu soin d'ajouter une petite quantité d'un hydrocarbure, de sucre par exemple.

Règles générales. — Tout milieu de culture doit :

1° *Contenir les substances nécessaires au développement du microbe qu'on y ensemencera ;*

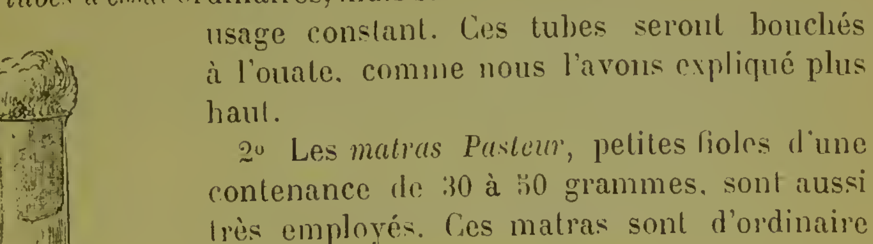
2° *Avoir été préalablement stérilisé ;*

3° *Être contenu dans des vases qui le mettent à l'abri de toute contamination par les germes extérieurs.*

Vases de culture. — Ils sont très variés; nous les décrirons à

mesure que nous en ferons usage; nous nous contenterons, pour le moment, de signaler les modèles les plus fréquemment utilisés pour la culture des aérobies.

1° Les *tubes à essai* ordinaires, mais sans rebord à l'orifice, sont d'un usage constant. Ces tubes seront bouchés à l'ouate, comme nous l'avons expliqué plus haut.



2° Les *matras Pasteur*, petites fioles d'une contenance de 30 à 50 grammes, sont aussi très employés. Ces matras sont d'ordinaire

Fig. 22. — Tube pour culture bouché à l'ouate.



Fig. 23. — Matras Pasteur.

bouchés au moyen d'un bouchon tubulaire en verre, embrassant leur col rodé à l'émeri, et muni d'une cheminée étroite portant un tampon d'ouate. Ce mode de fermeture protège très efficacement le contenu du ballon contre les diverses causes de souillure, mais il a l'inconvénient d'être très fragile : le bouchon de verre éclate souvent quand on le flambe avant d'ouvrir le matras.

Il est préférable de coiffer l'orifice des matras avec un petit capuchon de papier filtre (rouler une petite bande de papier filtre autour du col et en tortiller sur elle-même la partie supérieure), ou plus simplement encore de boucher ces flacons à l'ouate comme les tubes à essai.

Capuchons de caoutchouc. — Le bouchon d'ouate ne préserve pas le contenu des tubes de l'évaporation : pour conserver certains milieux solides,

tels que sérum, gélose, pomme de terre, etc., on devra empêcher cette évaporation en coiffant les tubes, préalablement bouchés à l'ouate, avec un capuchon de caoutchouc. Mais ces capuchons maintiennent l'ouate humide : il faut les stériliser avant leur application, sans quoi les germes qu'ils apporteraient finiraient par traverser l'ouate humide et souilleraient le contenu des tubes. On les stérilise à l'autoclave à 115° ou en les trempant dans le sublimé acide.

Il est encore plus simple, pour conserver les cultures de collection, de tremper l'extrémité des tubes bouchés à l'ouate dans la paraffine fondue.

Article I. — MILIEUX LIQUIDES.

§ 1er. — MILIEUX ANIMAUX.

Ils sont très variés ; nous décrirons les principaux en prenant comme type le bouillon de bœuf peptonisé, le plus fréquemment employé (1).

BOUILLON DE BŒUF PEPTONISÉ.

Ce milieu est d'un usage fréquent; nous le désignerons par le simple mot *bouillon*.

Préparation. — 1° Prendre 500 grammes de viande de bœuf, maigre, privée de tendons et d'aponévroses; la hacher menu, la faire macérer pendant quelques heures dans 1 000 grammes d'eau froide.

2° Cuire le tout à feu doux dans une casserole émaillée, remuer constamment avec une spatule. Porter lentement à l'ébullition, et prolonger celle-ci pendant dix minutes.

3° Jeter sur un torchon épais et propre, exprimer fortement le résidu, recueillir le liquide qui s'écoule et le filtrer chaud sur un filtre en papier épais (Chardin ou Prat-Dumas) et mouillé afin de retenir la graisse.

4° Verser le bouillon filtré dans une casserole émaillée, y ajouter :

Peptone sèche (Chapoteaut ou Witte).	10 grammes, soit	1 p. 100 de l'eau employée.
Sel marin..............................	5 —	soit 0,5 p. 100 —
Phosphate de soude................	Une pincée (environ 1 gramme).	

Porter à l'ébullition en agitant pour assurer la dissolution de la peptone.

5° Le liquide obtenu est fortement acide; il faut le neutraliser, les

(1) Nous ne décrirons que les milieux de culture d'un intérêt général : les variantes propres à l'étude de certaines espèces microbiennes seront décrites quand nous nous occuperons de ces espèces.

bactéries se développant de préférence en milieu *neutre* ou *légèrement alcalin*.

Pour cela, employer une solution normale de soude dont on verse, avec une pipette, de petites quantités dans le bouillon en ayant soin de vérifier fréquemment, avec le papier de tournesol, la réaction du liquide. On cesse d'ajouter de la soude dès que le papier rouge est très légèrement bleui par une goutte de bouillon porté à son contact avec un agitateur en verre. L'alcalinité doit être très peu prononcée; le bouillon est alors alcalin au tournesol et acide à la phtalléine.

Ce temps est le plus délicat de la préparation du bouillon; la quantité d'alcali à ajouter varie beaucoup avec les différentes viandes; aussi ne peut-on procéder que par tâtonnements. Ajouter très lentement la solution de soude, remuer avec soin la masse à chaque nouvelle addition. Quand on approche de la neutralisation, essayer le bouillon à la fois avec un papier rouge et un papier bleu de tournesol; il arrive un moment où une goutte de liquide ne fait virer aucun de ces deux papiers; il suffira alors d'ajouter une très petite quantité de soude pour avoir une alcalinité suffisante; Park et Williams ont montré que pour obtenir l'alcalinité favorable il faut ajouter au bouillon neutre 7 centimètres cubes de solution normale de soude par litre de bouillon (1).

6° Le bouillon alcalinisé est versé dans un matras en verre, ou mieux dans une boîte à lait en tôle émaillée et on le porte à l'autoclave à 115°-117° pendant cinq minutes. Le liquide se trouble et il abandonne des grumeaux de phosphates terreux.

Retiré de l'autoclave, il est jeté chaud sur un filtre Chardin mouillé : les grumeaux sont retenus et le filtrat doit être absolument limpide.

Cette opération a pour but de débarrasser le bouillon des phosphates terreux en excès; si l'on omettait de la pratiquer, le bouillon se troublerait lors de la stérilisation.

7° Le liquide limpide obtenu est ramené au volume de 1 000 centimètres cubes par addition d'eau distillée.

8° Le bouillon est alors terminé; il ne reste plus qu'à le répartir dans les vases de culture et à le stériliser.

a. Si l'on désire conserver le bouillon pour un usage éloigné, on peut le verser pour la stérilisation dans un grand matras fermé à l'ouate ou dont on étire le col à la lampe. Au moment du besoin, on répartira le liquide nutritif dans les vases de culture suivant le procédé indiqué page 47.

(1) La solution normale de soude contient 40 grammes de NaHO par litre d'eau distillée.

b. Mieux vaut répartir immédiatement le bouillon dans les tubes à essai ou les matras Pasteur :

1° Verser 10 à 15 centimètres cubes de bouillon par tube ou 25 centimètres cubes par matras.

Il faut dans cette opération se servir d'un petit entonnoir de verre pour ne pas mouiller l'orifice des tubes ; le bouillon desséché au contact du bouchon d'ouate ferait adhérer ce bouchon et on ne pourrait, par la suite, ouvrir le tube que difficilement ; cette précaution est encore plus importante quand on utilise une substance solidifiable comme la gélose ou la gélatine.

2° Fermer les tubes ou flacons à l'ouate.

3° Porter les vases à l'autoclave dans un panier en toile métallique et stériliser à 115° pendant vingt minutes, en ayant soin de ne pas dépasser cette température et en observant les règles exposées au chapitre premier (1).

BOUILLON DE VEAU.

Opérer comme ci-dessus en remplaçant la viande de bœuf par 500 grammes de viande maigre de veau.

BOUILLON DE POULE.

Se prépare comme les précédents, mais avec 500 grammes de chair musculaire de poule; rejeter avec soin la peau, les tendons, les os ,sans quoi le bouillon serait de consistance gélatineuse.

EAU DE VIANDE.

1° Sur 500 grammes de viande maigre de bœuf ou de veau, hachée, verser 1 000 grammes d'eau. Mettre à la glacière pendant douze heures.

2° Agiter le mélange, le passer sur un torchon, exprimer avec soin le résidu. Filtrer au papier Chardin le liquide obtenu.

3° Porter le filtrat à l'ébullition après l'avoir additionné de 5 grammes de sel marin.

4° Alcaliniser comme il a été dit pour le bouillon peptonisé.

5° Porter à l'autoclave à 115°-117° pendant cinq minutes.

6° Filtrer à chaud sur un filtre Chardin mouillé.

7° Ramener à 1 000 centimètres cubes par addition d'eau distillée.

8° Répartir dans des tubes et stériliser à 115°.

(1) Quelquefois, au sortir de l'autoclave, le bouillon présente un très léger louche qui disparait par le refroidissement.

SOLUTION DE PEPTONE DE MARTIN.

Bouillon de panse. — Bouillon d'estomac de porc.

1° Hacher menu des estomacs de porc, lavés et nettoyés (1).
2° Mélanger :

Hachis d'estomac	200	grammes.
Acide chlorhydrique pur	10	—
Eau à + 50°	1 000	—

Maintenir le mélange à 50° pendant douze à vingt-quatre heures.

3° Porter la macération à 100°, pour détruire la pepsine en excès, passer au tamis ou sur une couche mince et peu serrée de coton hydrophile.

4° Le liquide est porté à 80° et alcalinisé à cette température : de gros flocons précipitent en clarifiant le milieu, filtrer sur papier Chardin.

5° Porter cinq minutes à l'autoclave à 117°-120°. Filtrer sur papier Chardin.

6° Répartir ; stériliser à 115° pendant quinze à vingt minutes.

BOUILLON PEPTONISÉ DE MARTIN.

1° Hacher 500 grammes de viande maigre de veau, la faire macérer à l'étuve à 35°, pendant vingt heures dans 1 000 grammes d'eau.

2° Jeter la macération sur un torchon, exprimer fortement, ajouter au liquide 5 grammes de sel marin.

3° Mélanger le liquide obtenu avec parties égales de bouillon de panse préparé comme il est dit ci-dessus jusqu'au temps 4 inclusivement.

4° Porter le mélange à 70° pour coaguler les albuminoïdes, alcaliniser (neutraliser exactement, puis ajouter 7 centimètres cubes de solution normale de soude par litre) ; filtrer sur papier Chardin.

5° Stériliser par filtration sur bougie Chamberland, en employant un des dispositifs décrits au chapitre précédent. Répartir dans des vases de culture préalablement stérilisés.

SOLUTION DE PEPTONE DE KOCH.

1° Dissoudre à chaud dans 1 000 grammes d'eau, 10 grammes de peptone Witte ou Chapoteaut et 5 grammes de sel marin.

(1) Pour remédier aux variations de la teneur en pepsine que peuvent présenter les estomacs, il est bon de faire porter l'opération sur plusieurs viscères, cinq par exemple : le bouillon obtenu a ainsi une composition moyenne à peu près fixe.

Ne pas alcaliniser, la peptone étant suffisamment alcaline.

2° Porter à l'ébullition. Filtrer.

3° Répartir en tubes ou en ballons Pasteur. Stériliser à 115°.

PEPTO-GÉLO-SEL DE METCHNIKOFF.

1° Dissoudre à chaud dans 1 000 grammes d'eau :

Peptone (Chapoteaut ou Witte).........	10 grammes.
Sel marin...........................	5 —
Gélatine blanche extra..............	20 —

2° Alcaliniser très légèrement avec la solution de soude au dixième.

3° Porter cinq minutes à l'autoclave à 115°. Filtrer sur papier Chardin.

4° Répartir; stériliser à 115°.

SOLUTION DE PEPTONE DE MIQUEL.

1° Faire dissoudre à feu doux dans un litre d'eau :

Peptone Chapoteaut....................	20 grammes.
Sel marin	5 —

2° Ajouter $0^{gr},10$ de cendres de bois. Faire bouillir. Filtrer au Chardin.

3° Le liquide est d'ordinaire fortement alcalin; le neutraliser avec une solution d'acide tartrique ajoutée très prudemment en surveillant la réaction à l'aide du papier de tournesol.

4° Faire bouillir pendant cinq minutes. Filtrer. Ramener à 1 000 centimètres cubes.

5° Répartir en tubes; stériliser à 115°.

BOUILLON AU LIEBIG.

1° Dissoudre à feu doux 5 grammes d'extrait de viande Liebig dans 1 000 grammes d'eau. Alcaliniser si besoin.

2° Porter à l'autoclave à 115°-117° pendant cinq minutes. Filtrer à chaud sur un filtre mouillé.

3° Répartir en tubes; stériliser à 115°.

Ce milieu peut être additionné de 10 grammes de peptone Chapoteaut et de 5 grammes de sel marin. Ajouter ces substances avant l'alcalinisation.

On préparerait de même le bouillon à l'*extrait de Cibils* en remplaçant le Liebig par 20 grammes de cet extrait.

Ces milieux sont surtout employés dans les laboratoires allemands.

BOUILLON DE THYMUS (BRIEGER).

1° Recueillir aussitôt après la mort des animaux deux ou trois thymus de veau; les hacher menu et ajouter à la pulpe obtenue un poids égal d'eau distillée. Mêler, laisser macérer douze heures.

2° Filtrer sur une gaze, exprimer le résidu. La sérosité trouble et visqueuse obtenue est additionnée de son poids d'eau.

3° Au liquide ajouter une solution de carbonate de soude à 1 p. 10 jusqu'à réaction faiblement alcaline.

4° Porter à 100°, pendant quinze minutes, dans l'autoclave ou la marmite de Koch (une température supérieure altérerait le milieu).

Filtrer sur un linge fin.

5° Répartir en tubes préalablement flambés au four Pasteur.

Stériliser à 100° pendant quinze minutes et recommencer la stérilisation le lendemain.

Certains microbes, tels que le V. du choléra, ne se développent bien dans ce milieu que si on a soin, au moment de l'utiliser, d'ajouter 5 à 6 volumes d'eau stérile au contenu des tubes.

BOUILLON GLYCÉRINÉ.

Au bouillon de bœuf peptonisé on ajoute, au temps 7 de la préparation, avant la répartition en tubes, 5 p. 100, soit 50 grammes par litre, de glycérine pure.

Ce bouillon peut encore être préparé avec le bouillon glucosé obtenu comme il est dit ci-dessous.

BOUILLONS SUCRÉS.

Au bouillon de bœuf on ajoute, au temps 4, en même temps que la peptone et le sel :

	Glucose.............	2 à 4 p. 100..........	Bouillon glucosé.
ou	Lactose.............	—	— lactosé.
ou	Mannite............	—	— mannité.
ou	Sucre de canne......	—	— sucré.

Terminer l'opération comme pour le bouillon ordinaire.

BOUILLON CARBONATÉ.

A un bouillon lactosé, mannité ou glucosé, on ajoute avant la répartition en tubes (temps 7) 2 p. 100 de carbonate de chaux.

Le bouillon lactosé-carbonaté est le plus ordinairement employé. Quand

on cultive dans ces bouillons un microbe attaquant les sucres, les acides produits par la fermentation mettent en liberté l'acide carbonique du sel de chaux et il se manifeste dans le tube une vive effervescence.

LAIT.

Le lait peut être utilisé de plusieurs façons comme milieu de culture :

A. — Répartir du lait frais, de réaction alcaline, dans des tubes à essai (15 à 20 centimètres par tube).

Boucher à l'ouate.

Stériliser à 115° pendant vingt minutes.

Ce procédé est le plus simple; il suffit pour la grande majorité des recherches; c'est celui que nous emploierons d'ordinaire.

B. — On peut se proposer d'éviter au lait la stérilisation à 115°, cette température modifiant légèrement les qualités du liquide.

Dans ce cas, après avoir lavé soigneusement le pis de la vache et s'être aseptisé les mains, l'opérateur recueille le lait, à mesure qu'il sort du pis sous l'influence de la traite, dans les ballons stérilisés.

Les ballons sont remplis aux trois quarts, fermés à la lampe et chauffés pendant huit jours au bain-marie entre 60° et 65°, comme il est dit page 13.

La stérilisation terminée, le lait peut être réparti dans des tubes flambés, comme il sera dit à propos du sérum (p. 47).

C. — Duclaux a recommandé le procédé suivant, d'exécution délicate, mais qui permet d'obtenir du lait stérilisé sans avoir recours au chauffage :

1° Préparer des tubes à essai, boucher à l'ouate et flamber au four Pasteur.

2° Le pis de la vache est lavé et brossé au savon, rincé à l'eau stérile ; les mains de l'opérateur sont aseptisées.

3° On commence la traite, les premiers jets de lait en s'écoulant lavent la paroi des canaux excréteurs.

4° Au bout d'un instant de traite, un aide flambe l'orifice d'un tube stérile, en retire le bouchon d'ouate et présente cet orifice au jet de lait qui sort du trayon. Le tube doit être présenté très près du trayon, sans le toucher cependant. Le tube étant à moitié plein, l'aide replace le bouchon d'ouate.

5° Préparer ainsi un certain nombre de tubes et les mettre en observation pendant quarante-huit heures à l'étuve à 30° avant de les utiliser. Malgré toutes les précautions prises, un certain nombre de ces tubes sont contaminés; rejeter tout tube dont le lait se coagule, ou dans le contenu duquel l'examen microscopique montrerait la présence de bactéries.

URINE.

L'urine a été très employée comme milieu de culture, au début des recherches bactériologiques ; son emploi est à peu près délaissé aujourd'hui.

A. — 1° Porter à l'ébullition de l'urine fraîche.

2° Si la réaction est devenue fortement alcaline par l'ébullition, ajouter un peu d'une solution d'acide tartrique, sous le contrôle du papier de tournesol.

3° Filtrer, répartir en tubes, stériliser à 115°.

Ce procédé modifie sensiblement la composition de l'urine, l'urée en solution étant altérée par la température de l'ébullition.

B. — Pour obtenir de l'urine stérile, sans chauffage et par conséquent sans altération de sa composition, on opérera de la façon suivante :

1° Prendre une sonde de caoutchouc rouge, en coiffer l'extrémité supérieure avec un capuchon de papier filtré, puis envelopper avec soin la sonde dans plusieurs doubles de papier et la stériliser à 115° pendant vingt minutes. Le paquet sorti de l'autoclave est séché rapidement à l'étuve.

2° Laver soigneusement avec la solution d'oxycyanure à 1 p. 1 000 le gland et le méat d'un homme placé dans le décubitus dorsal ; essuyer avec une compresse stérilisée à l'autoclave, entourer la verge avec une compresse également stérilisée. Les mains de l'opérateur sont aseptisées.

3° Déplier le papier qui enveloppe la sonde, saisir celle-ci par son extrémité supérieure, tremper son extrémité inférieure dans de l'huile stérilisée à 115°.

4° La sonde, reposée sur son papier d'enveloppe, est approchée du méat. La main gauche de l'opérateur fixe la verge, sa main droite saisit la sonde vers la partie moyenne, l'engage dans le méat et la pousse dans le canal, son extrémité supérieure glissant sur le papier que maintient un aide.

5° Aux approches de la vessie l'opérateur serre fortement la sonde entre le pouce et l'index, puis le sphincter est franchi.

6° L'aide flambe le col d'une fiole préalablement stérilisée au four, en enlève le bouchon d'ouate, puis en présente l'orifice à l'extrémité de la sonde dont il a ôté le capuchon de papier.

7° L'opérateur desserre les doigts et l'urine s'écoule dans le flacon ; celui-ci étant aux trois quarts plein, l'opérateur arrête la sortie de l'urine en comprimant la sonde, l'aide flambe le col de la fiole et y replace le tampon d'ouate qu'il a tenu de la main gauche pendant le remplissage.

8° L'urine est répartie en tubes par le procédé indiqué à propos du sérum (p. 47). Ces tubes sont mis en observation à l'étuve à 30° pendant trente-six à quarante-huit heures : on rejetterait ceux dont le contenu aurait troublé.

SÉRUM.

Le sérum, obtenu par la coagulation spontanée du sang ou provenant des épanchements pleurétiques, est quelquefois employé comme milieu de culture liquide, mais il est beaucoup plus souvent utilisé après solidification par l'action de la chaleur.

Nous étudierons la technique de la récolte du sérum à propos des milieux solides.

§ 2. — MILIEUX VÉGÉTAUX.

Les infusions végétales sont peu fréquemment utilisées en technique microbiologique ; nous citerons les principales d'entre elles.

EAU DE LEVURE.

a. Délayer 100 grammes de levure dans 1 000 grammes d'eau ; porter à l'ébullition ; filtrer au papier Chardin.

Le filtrat légèrement acide est réparti en tubes ou matras Pasteur et stérilisé à 115°.

On peut neutraliser ou alcaliniser légèrement l'eau de levure en y ajoutant avec précaution de la solution normale de soude avant la filtration. L'addition à l'eau de levure de 5 p. 100 de sucre ou de glucose, avant la filtration, augmente ses propriétés nutritives.

Dans le cas où le liquide resterait louche après la filtration, on y ajouterait un peu d'acide phosphorique officinal (1), puis de l'eau de chaux en quantité suffisante pour ramener à une réaction faiblement alcaline. Porter alors cinq minutes à 115°-116°. Filtrer. Répartir en tubes. Stériliser à 115°.

EAU DE LEVURE PEPTONISÉE DE SPRONCK.

1° Délayer dans 5 litres d'eau 1 000 grammes de levure du commerce (et non de brasserie).

2° Porter le mélange pendant vingt minutes à l'ébullition en remuant fréquemment ; puis le verser dans des vases cylindriques où on l'abandonne au repos pendant vingt-quatre heures.

3° Décanter le liquide louche, l'additionner de 5 grammes de sel marin et de 10 grammes de peptone de Witte par litre.

4° Neutraliser exactement, puis ajouter 7 centimètres cubes de

(1) L'acide phosphorique officinal, de densité de 1,349, contient 36gr,4 d'acide anhydre p. 100.

solution normale de soude par litre; porter à l'ébullition, puis filtrer sur papier Chardin (1).

3° Répartir dans des matras; stériliser à 115°-120°.

EAU DE MALT.

1° 100 grammes d'orge germée (malt) sont broyés, puis délayés dans 1 000 grammes d'eau.

2° Maintenir pendant une heure le mélange à 55°-58°; la diastase transforme l'amidon en maltose et on obtient un véritable moût de bière (ne pas dépasser 58° dans cette préparation, sans quoi la diastase serait détruite).

3° Porter ensuite à l'ébullition. Filtrer sur papier Chardin.

4° Répartir; stériliser à 115°.

EAU DE TOURAILLONS.

Les touraillons sont constitués par les plantules de l'orge germée. Dans 1 000 grammes d'eau, faire macérer à une douce chaleur pendant une à deux heures 100 grammes de touraillons. Porter ensuite à l'ébullition; filtrer, répartir, stériliser à 115°.

INFUSIONS DE FOIN ET DE PAILLE.

Faire macérer pendant une heure ou deux 15 à 20 grammes de foin ou de paille coupés menu dans 1 000 grammes d'eau. Porter à l'ébullition pendant quelques minutes; filtrer, répartir, stériliser à 115°.

Cette infusion, légèrement acide, peut être neutralisée selon les règles ordinaires.

INFUSION DE POMME DE TERRE.

Éplucher et râper une pomme de terre; délayer dans 1 000 centimètres cubes d'eau 20 à 30 grammes de la pulpe. Laisser en contact pendant trois ou quatre heures; décanter, porter le liquide à l'ébullition; filtrer, répartir, stériliser. L'infusion, souvent acide, peut être neutralisée avant la filtration.

DÉCOCTION DE FRUITS SECS.

1° Dans 1 000 centimètres cubes d'eau, faire macérer pendant plusieurs heures 50 à 100 grammes de fruits secs (pruneaux ou raisins), puis les faire cuire dans cette eau.

2° Passer au tamis grossier.

(1) Si la levure contient de la fécule, le liquide filtré reste un peu louche, ce qui est sans inconvénient.

3° Porter le liquide à l'ébullition ; filtrer.
4° Répartir ; stériliser à 115°.

Le liquide obtenu est légèrement acide ; il convient tel quel pour la culture des moisissures ; dans les autres cas le neutraliser avec la solution de soude avant de le porter à l'ébullition (temps 3).

VIN.

Très employé par Pasteur au début de ses recherches ; n'est guère utilisé aujourd'hui. Avant de le stériliser, le neutraliser ou l'alcaliniser légèrement avec la solution de soude selon les règles ordinaires.

§ 3. — MILIEUX ARTIFICIELS.

Ces milieux, peu employés dans la pratique courante, ont été utilisés pour étudier certains points de la biologie des microbes.

Les plus connus sont les suivants :

LIQUIDE DE PASTEUR.

Eau	100 grammes.
Sucre candi	10 —
Acétate d'ammoniaque	1 gramme.
Cendres de levure	0gr,075

Faire bouillir, filtrer, répartir, stériliser. La réaction en est alcaline.

LIQUIDE DE COHN.

Eau distillée	100 grammes.
Tartrate d'ammoniaque	1 gramme.
Phosphate de potasse	0gr,5
Sulfate de magnésie	0gr,5
Phosphate tricalcique	0gr,5

Même préparation. Réaction alcaline.

LIQUIDE DE NÆGELI.

Eau	1 000 grammes.
Tartrate d'ammoniaque	10 —
Phosphate de potasse	1 gramme.
Sulfate de magnésie	0gr,2
Chlorure de calcium	0gr,12

Même préparation que précédemment.

LIQUIDE DE RAULIN.

Eau	1 500 grammes.
Sucre candi	70 —
Acide tartrique	4 —
Nitrate d'ammoniaque	4 —
Phosphate d'ammoniaque	0gr,6
Carbonate de potasse	0gr,6
Carbonate de magnésie	0gr,4
Sulfate d'ammoniaque	0gr,25
Sulfate de zinc	0gr,07
Sulfate de fer	0gr,07
Silicate de potasse	0gr,07

Réaction acide. — A servi aux célèbres recherches sur l'*Aspergillus niger*.

Article II. — MILIEUX SOLIDES.

Les milieux solides ont été introduits dans la technique par Schrœter et surtout par Koch. Les plus utilisés sont les milieux transparents obtenus en ajoutant au bouillon de viande des substances susceptibles de le solidifier à la température ordinaire ; puis viennent les albumines solidifiées par la chaleur (sérum, œuf, etc.), la viande et enfin certaines préparations végétales.

§ 1er. — MILIEUX A BASE DE GÉLATINE.

Les milieux à base de gélatine sont très employés, on en prépare plusieurs sortes.

Règles générales. — 1° Se servir de gélatine extra-fine, de marque française, qui se trouve dans le commerce en minces plaques quadrillées pesant environ 2gr,50. Si l'on employait la gélatine commune, celle-ci perdant la propriété de se solidifier quand elle a été portée à 102°-105°, on serait forcé de stériliser le milieu à 100°, ce qui complique les manipulations.

2° La gélatine est très acide : il faut neutraliser le milieu après l'addition de cette substance, mais s'arrêter à une *réaction neutre* ou très faiblement alcaline, la gélatine ne se solidifiant plus quand elle a été chauffée au contact d'un alcali.

3° Les milieux à base de gélatine, se liquéfiant à + 25°, ne sont utilisables que pour les cultures pratiquées à une température ne dépassant pas 20° à 23°.

GÉLATINE ORDINAIRE.

Procédé recommandé. — C'est ce produit que nous désignerons dorénavant par le mot *gélatine*.

Opérer de même façon que pour la préparation du bouillon :

1°, 2° et 3° Mettre 500 grammes de viande maigre de bœuf dans 1 000 grammes d'eau, cuire, exprimer, filtrer à chaud.

4° A ce bouillon ajouter :

Peptone Chapoteaut ou Witte........	10 grammes.
Sel marin..............................	5 —
Phosphate de soude.....................	Une pincée.
Gélatine extra.........................	80 à 120 grammes.

Suivant la saison il faut varier la quantité de gélatine ; en hiver une gelée à 8 p. 100 suffit (80 grammes), en été il faut atteindre 10 à 12 p. 100 soit 120 grammes).

Chauffer le tout à feu doux dans une casserole émaillée en agitant constamment pour empêcher la gélatine de prendre au fond ; après dissolution, faire bouillir pendant deux à trois minutes.

5° Le liquide obtenu est très acide ; y ajouter de la solution de soude avec prudence, en vérifiant à chaque instant la réaction à l'aide du papier de tournesol. — Se contenter de la neutralisation ou d'une très légère alcalinisation.

6° Porter dans une boîte à lait à l'autoclave à 115° pendant cinq minutes ; les phosphates terreux se précipitent.

7° Au sortir de l'autoclave, jeter le liquide chaud sur un filtre Chardin mouillé et disposé sur un *entonnoir à filtration chaude* ; la filtration doit avoir lieu à chaud, sans quoi la gélatine se prendrait en masse et ne traverserait pas le filtre.

Entonnoir à filtration chaude. — C'est un entonnoir en cuivre monté sur pieds (fig. 24) et dans lequel on place un second entonnoir de verre dont la douille s'engage dans celle de l'entonnoir métallique qu'elle obture complètement par l'intermédiaire d'un bouchon ; par un petit tube latéral on verse de l'eau dans l'espace compris entre les deux parois ; on chauffe l'appareil en plaçant un bec de Bunsen sous un appendice que porte la partie inférieure de l'entonnoir métallique. Ne pas atteindre la température d'ébullition, sans quoi il se produirait des projections par le tube de remplissage. Chauffer l'entonnoir avant que d'y verser la gélatine.

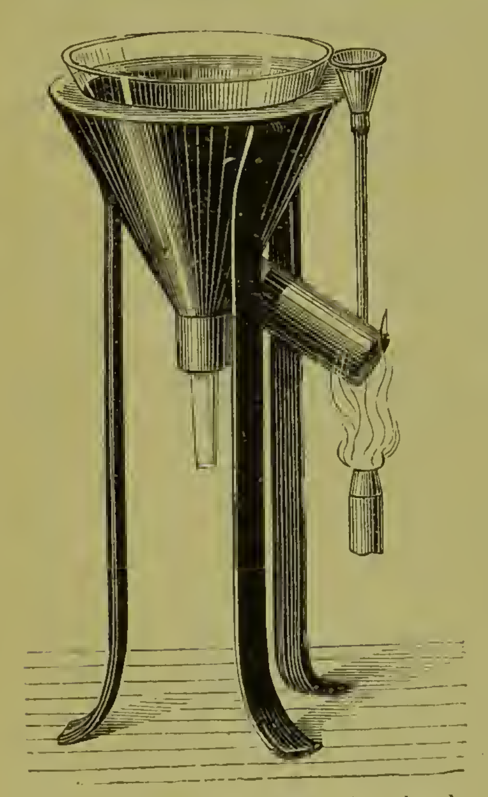


Fig. 24. — Entonnoir à filtration chaude.

Il existe plusieurs modèles de ces appareils, une modification heureuse consiste à utiliser un entonnoir à double paroi métallique et dans lequel on pose l'entonnoir de verre. On peut encore, plus simplement, disposer le filtre sur un entonnoir de verre placé sur un matras à fond plat : le tout est mis dans l'autoclave dont on porte l'eau à l'ébullition, la filtration se fait très bien dans ces conditions.

8° Au sortir du filtre le liquide est recueilli dans un vase à saturation et immédiatement réparti — avant qu'il soit solidifié — dans des tubes à essai (10 à 15 centimètres cubes par tube).

Faire toujours cette répartition à l'aide d'un petit entonnoir de verre.

pour ne pas déposer de gélatine sur l'orifice des tubes, ainsi que nous l'avons expliqué page 30.

Le milieu doit être parfaitement clair.

9° Boucher les tubes à l'ouate; stériliser à 112°-113° pendant vingt minutes sans atteindre la limite extrême de 115°.

GÉLATINE AU LIEBIG.

1° Dissoudre 5 grammes de Liebig dans 1 000 grammes d'eau (ajouter facultativement 10 grammes de peptone et 5 grammes de sel marin), puis dissoudre dans le liquide 100 grammes de gélatine ; faire bouillir pendant deux à trois minutes.

2° Neutraliser ;
3° Chauffer à 115° ; filtrer ;
4° Répartir; stériliser;
} Comme il a été dit plus haut.

RAISIN-GÉLATINE.

1° Faire, comme il a été dit page 36, une décoction de 250 grammes de raisins secs dans 1 000 grammes d'eau.

2° Après filtration, ajouter 100 grammes de gélatine et une pincée de phosphate de soude, faire bouillir deux à trois minutes.

3° Neutraliser ;
4° Chauffer à 115° ; filtrer à chaud ;
5° Répartir, stériliser;
} Comme plus haut.

GÉLATINE DE BUCHNER.

1° Dissoudre à chaud dans 1 000 grammes d'eau :

Gélatine extra	100	grammes.
Sucre de canne	20	—
Extrait de Liebig	5	—
Peptone sèche	5	—

2° Ajouter à la dissolution :

Phosphate tricalcique	5	grammes.

3° Faire bouillir quelques minutes ; porter à 115°, filtrer et terminer comme d'ordinaire.

GELÉE DE POMME DE TERRE (D'APRÈS ELSNER).

1° Prendre 500 grammes de pommes de terre, les peler, les râper.

2° Faire macérer la pulpe obtenue dans un litre d'eau pendant trois à quatre heures.

3° Tamiser; laisser reposer une nuit. Décanter.

4° Ramener le volume à 1000 centimètres cubes; y dissoudre à feu doux 15 à 20 p. 100 (150 à 200 grammes) de gélatine. Faire bouillir quelques minutes.

5° Au liquide très acide ajouter de la solution de soude jusqu'à réaction faiblement, mais encore *nettement acide*.

6° Porter à 115°, cinq minutes, filtrer et terminer comme d'ordinaire.

§ 2. — MILIEUX A BASE DE GÈLOSE.

La *gélose* ou *agar-agar* est une algue de l'océan Indien et se trouve dans le commerce sous forme de lames fibrillaires sèches.

Cette substance a la propriété de former avec l'eau, par la cuisson, des gelées résistantes pouvant supporter, sans se liquéfier, les températures inférieures à + 60°. La gélose sera donc substituée à la gélatine toutes les fois qu'on désirera obtenir un milieu solide pouvant supporter des températures supérieures à + 25°.

La préparation des milieux gélosés se trouve rendue laborieuse par ce fait que l'agar-agar forme avec l'eau une gelée épaisse, se prenant facilement en masse, très difficile à filtrer. On tourne cette difficulté en modifiant les propriétés de la gélose par une cuisson prolongée ou par des procédés chimiques (action des acides).

De plus les gelées d'agar-agar seraient toujours troubles si on n'avait soin de les clarifier au moyen de l'albumine; même après cette opération, elles restent légèrement opalescentes.

GÉLOSE ORDINAIRE.

Procédé recommandé. — C'est le produit obtenu par ce procédé que nous aurons en vue chaque fois que nous parlerons de *gélose*.

1° Préparer comme il a été dit page 28 un bouillon de bœuf peptonisé, s'arrêter au temps 5 inclus.

2° Ajouter alors à ce bouillon 15 à 20 grammes d'agar-agar (1,5 à 2 p. 100) coupé en menus fragments.

L'agar doit avoir préalablement trempé dans l'eau froide pendant une heure ou deux, puis avoir été exprimé dans un linge.

3° Porter le mélange à 100° dans une casserole émaillée et le maintenir à cette température, en ayant soin de remuer constamment, pendant le temps nécessaire à la dissolution de l'agar (environ trente minutes).

4° Vérifier la réaction du liquide, réaction qui doit toujours être

neutre ou faiblement alcaline (la gélose se transforme en sucre quand elle est chauffée en milieu acide).

5° Laisser refroidir à 55° ou 60° et ajouter un blanc d'œuf délayé et battu dans 100 grammes d'eau. Bien mélanger le tout.

6° Porter le mélange à l'autoclave à 120° pendant au moins une heure. L'albumine se coagule en formant un magma qui entraîne les impuretés.

7° Au sortir de l'autoclave jeter le liquide sur un filtre en papier Chardin mouillé et placé dans l'entonnoir à filtration chaude; couvrir l'entonnoir avec une plaque de verre.

8° A mesure que le liquide filtré s'écoule de l'entonnoir, le recueillir dans un vase à saturation préalablement chauffé et le répartir aussitôt dans des tubes. Opérer très rapidement pour éviter la solidification; se servir d'un entonnoir pour faire la répartition afin de ne pas mouiller l'orifice des tubes. Verser 8 à 10 centimètres cubes par tube.

9° Stériliser à 115° pendant vingt minutes. Pendant que les tubes sont encore chauds, les disposer sur un plan incliné ou sur le plateau figuré page 53 afin que la gélose se solidifie en surface oblique; laisser les tubes environ trente-six heures dans cette position.

Pour que la mince couche de gélose ne se détache pas de la paroi du tube, quand on place celui-ci verticalement, on a recommandé d'ajouter au milieu une petite quantité de gomme arabique dissoute dans l'eau; nous déconseillons cette pratique qui communique toujours au milieu un trouble assez prononcé et qui est inutile; si l'on exécute de point en point le procédé que nous indiquons on obtient une gélose suffisamment adhérente.

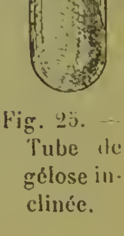


Fig. 25. — Tube de gélose inclinée.

Variante. — Bien que le procédé ci-dessus donne d'excellents résultats, on rend la filtration encore plus facile en usant de l'artifice suivant :

L'agar avant d'être ajouté au bouillon (temps 2) est mis à tremper pendant vingt-quatre heures dans une solution d'acide chlorhydrique à 6 p. 100 (eau, 500; HCl, 30). Au bout de ce temps on lave l'agar à grande eau, puis on le couvre avec une solution d'ammoniaque liquide à 5 p. 100 (eau, 500; ammoniaque, 25). Après quelques heures de contact, laver l'agar à grande eau, exprimer dans un linge et continuer la préparation comme nous l'avons dit.

La gelée ainsi obtenue est peu adhérente, aussi déconseillons-nous l'emploi de cette variante.

GÉLOSE DE MALM.

Au bouillon de Liebig ou de Cibils (Voy. p. 32) ajouter 2 p. 100 d'agar. Opérer comme pour la gélose ordinaire.

PEPTONE-AGAR DE SALOMONSEN.

1° Faire un bouillon avec :

Eau	1 000 grammes.
Extrait de Liebig	5 —
Peptone	30 —
Sucre de canne	5 —

Alcaliniser légèrement, si besoin est.

2° Dissoudre dans le bouillon 15 grammes d'agar et terminer la préparation comme il a été dit plus haut.

GÉLOSE GLYCÉRINÉE.

Préparer un bouillon glycériné (p. 33), y ajouter 2 p. 100 d'agar et opérer comme d'ordinaire.

GÉLOSE GLUCOSÉE-GLYCÉRINÉE.

Préparer un bouillon glucosé (p. 33); après la neutralisation ajouter 5 p. 100 de glycérine neutre et 2 p. 100 d'agar. Opérer comme d'ordinaire.

AGAR-GÉLATINE.

On arrive à préparer un milieu dont le point de fusion est compris entre ceux de la gélatine et de la gélose en mélangeant ces deux substances. En été ce milieu peut être substitué avec avantage à la gélatine; le préparer de la manière suivante :

1° A 1 000 grammes de bouillon ajouter :

Gélatine	80 grammes.
Gélose	5 —

ou

Gélatine	50 grammes.
Gélose	8 —

Avoir soin de faire dissoudre d'abord la gélatine dans le bouillon, de neutraliser et d'ajouter seulement alors la gélose.

2° Terminer l'opération comme pour la gélose ordinaire, mais en se contentant de chauffer à 115° pendant trente minutes (temps 6).

MOUSSE D'ISLANDE.

Certains auteurs ont remplacé l'agar par la mousse d'Islande (*Lichen crispus*); cette substitution n'est pas à recommander.

§ 3. — MILIEUX ALBUMINEUX.

SÉRUM.

Le sérum est le liquide qui se sépare par la coagulation du sang; en technique bactériologique on utilise surtout le sérum du bœuf et celui du cheval. Le sérum est employé, rarement à l'état liquide, plus souvent après coagulation par la chaleur.

La qualité capitale des milieux de culture au sérum est qu'ils doivent conserver une transparence presque complète, aussi ne peut-on les porter à une température élevée qui déterminerait leur coagulation en masse et les rendrait opaques : le sérum liquide ne doit pas être chauffé à plus de 56 ou 58° ; le sérum solidifié doit être coagulé aux environs de 70° pour conserver sa transparence.

Le sérum ne pourra donc être stérilisé par les procédés ordinaires; il faudra :

A. — Le stériliser par la pasteurisation combinée à la tyndallisation (procédé de Koch).

B. — Utiliser la propriété qu'a le sang d'être stérile dans l'organisme sain, recueillir ce sang aseptiquement et préparer le sérum en le plaçant à l'abri de toute contamination (procédé de Roux et Nocard).

RÉCOLTE DU SÉRUM.

A. **Procédé de Koch.** — *Instrumentation.* — Préparer d'avance :

1° Trois à quatre cristallisoirs à cloche, composés chacun de deux

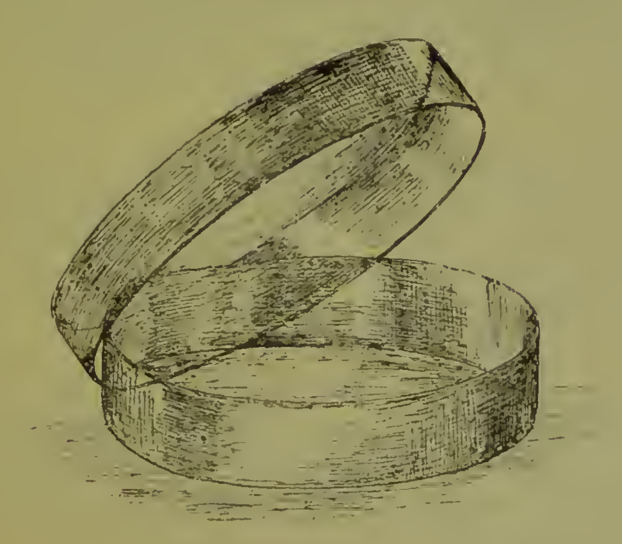


Fig. 26. — Cristallisoir à cloche.

cristallisoirs de deux litres environ de capacité s'emboîtant l'un dans l'autre (fig. 26).

Ces cristallisoirs enveloppés de papier sont stérilisés à 180° dans le four Pasteur, en ayant soin de chauffer très lentement pour ne pas les briser.

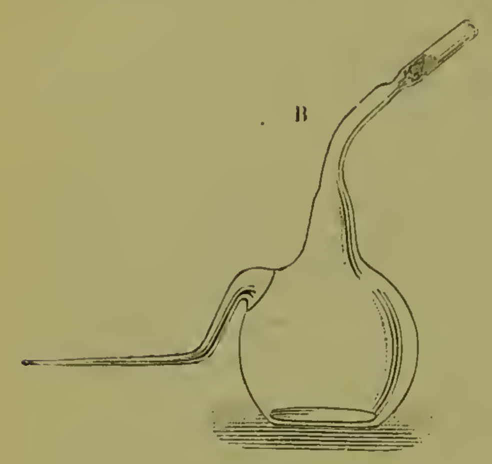


Fig. 27. — Matras répartiteur.

2° Des matras répartiteurs de Chamberland; les laver, les sécher avec soin, fermer à la lampe l'extrémité effilée, munir le tube B d'un tampon d'ouate placé au-dessus de l'étranglement (fig. 27); stériliser à 180°.

3° Des ballons à long col de contenance de 500 grammes; les boucher à l'ouate et les stériliser à 180°.

4° Des tubes à essai bouchés à l'ouate et flambés.

Opération. — 1° L'opérateur se transporte à l'abattoir (de préférence par un temps frais) muni des cristallisoirs stérilisés. Les cristallisoirs sont débarrassés du papier qui les entoure et au moment même où l'on opère la saignée d'un bœuf, l'opérateur soulève le couvercle d'un cristallisoir, expose le récipient au jet de sang et l'emplit aux trois quarts. Le cristallisoir est recouvert de suite. Recueillir ainsi du sang dans plusieurs cristallisoirs.

2° Les cristallisoirs sont déposés dans un endroit frais, où on les laisse au repos pendant environ trente-six heures. Ne pas placer les cristallisoirs dans de la glace, ce qui provoquerait la dissolution de l'hémoglobine et communiquerait une teinte rougeâtre au sérum.

3° Au bout de trente-six heures, le caillot s'est formé; le sérum clair s'est séparé; briser la pointe effilée d'un matras de Chamberland, passer cette extrémité effilée dans la flamme d'une lampe à alcool et, en opérant aussi purement que possible, aspirer le sérum dans le matras; fermer à la lampe la pointe du matras;

4° Le caillot a retenu une certaine quantité de sérum, dissocier ce caillot avec un agitateur de verre flambé; après quelques heures de repos recueillir à part la nouvelle quantité de sérum qui s'est séparée. Ce sérum, moins clair que le précédent, pourra néanmoins trouver son utilisation.

Variante recommandée. — L'opération est plus aisée à conduire et donne un meilleur rendement en sérum si l'on utilise, pour recueillir le sang, à la

place des cristallisoirs stérilisés, l'*appareil de Latapie*, que nous décrirons plus loin (p. 51) : dans ce cas, on remplace le tube *a* de l'appareil par un entonnoir stérile dans lequel on reçoit le sang qui jaillit de la saignée; la récolte faite, on enlève l'entonnoir, on lui substitue un bouchon de caoutchouc, puis on termine l'opération selon la technique exposée page 51. Le sérum obtenu est stérilisé comme ci-dessous.

5° Les matras de Chamberland pleins de sérum sont rapportés au laboratoire. Le sérum, quelques précautions qu'on ait prises, a été plus ou moins souillé au cours des opérations, il reste à le stériliser. On commence par le répartir dans les ballons à long col : pour cela, après avoir flambé dans un bec de Bunsen l'orifice du ballon, on soulève le tampon d'ouate; la tubulure effilée du matras de Chamberland, préalablement passée dans la flamme et dont la pointe a été cassée avec une pince flambée, est introduite profondément dans le col du ballon et en soufflant par le tube B on fait écouler le sérum dans la panse du ballon. Pendant tout ce temps le bouchon d'ouate de celui-ci est tenu entre le pouce et l'index de la main gauche.

6° Le ballon étant aux trois quarts plein, son bouchon d'ouate est replacé et on en porte le col dans la flamme du chalumeau à gaz, de façon à le sceller à quelques centimètres de la panse. On emplit autant de ballons qu'il en faut pour contenir le sérum recueilli.

7° Les ballons ainsi préparés sont portés dans le bain-marie décrit page 13 et chauffés, comme il a été dit, une heure à 56°-58° pendant huit jours consécutifs.

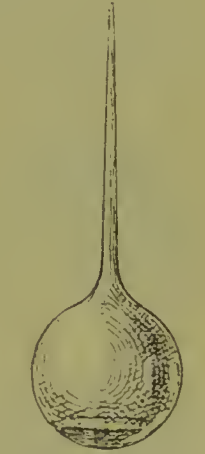


Fig. 28. — Ballon dont le col a été effilé et fermé à la lampe.

8° La stérilisation étant ainsi obtenue, il reste à répartir le sérum en tubes. Avec un couteau à verre on raye le col du ballon un peu au-dessous de l'extrémité fermée à la lampe, puis on appuie sur l'encoche produite la pointe effilée d'un tube de verre fondue et portée au rouge blanc : une fêlure se produit. On fait progresser la fêlure en touchant son extrémité avec la pointe de verre chauffée à blanc ; les deux extrémités du trait de fracture se rejoignent bientôt et l'on peut facilement séparer, par un léger choc, un capuchon de verre comprenant toute la partie du col scellée à la lampe : le ballon est ouvert.

Placer le ballon sur un valet de paille de telle sorte que son col ait une position presque horizontale.

Flamber dans un bec Bunsen la tubulure effilée d'un matras de

Chamberland stérilisé, en casser la pointe avec une pince flambée, introduire l'effilure dans le ballon en touchant presque le fond et aspirer le sérum dans le matras. Arrêter l'aspiration de façon à laisser dans le ballon la couche superficielle du liquide, couche qui s'est

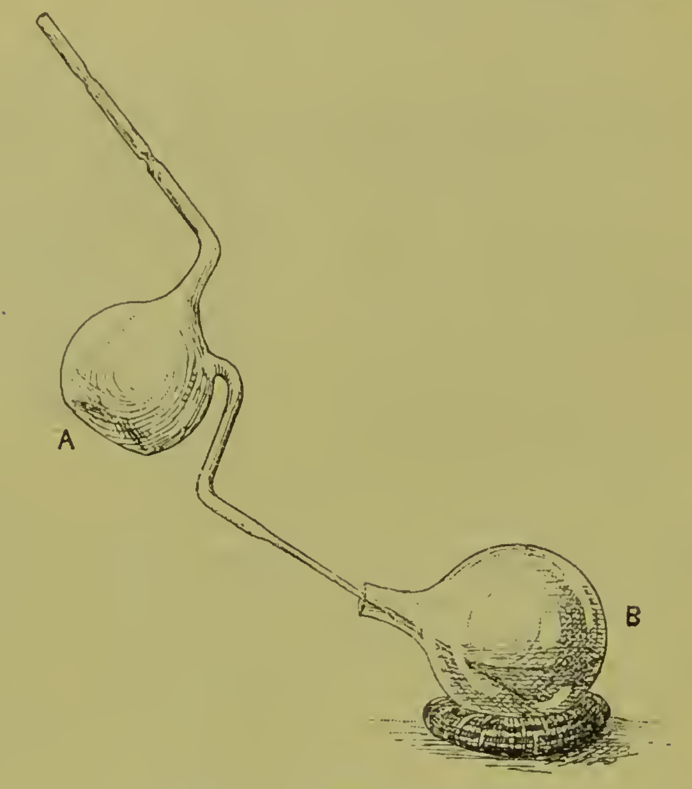


Fig. 29. — Répartition du sérum.

trouvée au contact de l'air et a pu être souillée par les poussières atmosphériques (fig. 29).

9° A l'aide du matras répartir le sérum dans des tubes flambés : passer rapidement dans la flamme la tubulure effilée du matras, flamber l'orifice d'un tube avant d'en enlever le bouchon d'ouate, faire pénétrer l'effilure dans le tube et faire couler dans celui-ci environ 10 centimètres cubes de sérum; replacer le bouchon d'ouate du tube.

Le sérum est alors prêt, soit pour servir à l'état liquide (après observation de quarante-huit heures à l'étuve à 30°), soit pour être gélatinisé.

Dans ce dernier cas, la gélatinisation doit être opérée le plus rapidement possible : si quelques germes avaient pénétré dans les tubes pendant la répartition, ils risqueraient fort d'être détruits par la chauffe de coagulation.

B. **Procédé de Roux et Nocard.** — Ce procédé a sur le précé-

dent l'avantage de fournir un sérum beaucoup plus clair et plus favorable aux cultures; il devra être mis en usage chaque fois que les circonstances le permettront.

Instrumentation. — Préparer :

1° Un trocart de Nocard (fig. 30), sur la canule duquel, le mandrin



Fig. 30. — Trocart de Nocard.

étant enlevé, peut s'adapter un ajutage métallique qui porte un tube de caoutchouc rouge long de 50 centimètres environ et terminé à son extrémité inférieure par un tube de verre de 15 centimètres de longueur.

Le trocart et le tube de caoutchouc muni de son ajutage sont enveloppés séparément dans du papier filtre et stérilisés à l'autoclave, ou plus simplement plongés pendant dix minutes dans de l'eau bouillante, au moment de l'opération ;

2° Un ciseau courbe sur le plat et un bistouri également aseptisés par ébullition ;

3° Un ou deux flacons à large ouverture de 3 litres environ de capacité.

Ces flacons, bien lavés, sont séchés, puis on coiffe leur orifice avec deux ou trois doubles de papier qu'on assujettit sur le col à l'aide d'une ficelle; par-dessus ce premier bouchage on en fait un second identique mais fixé avec une ficelle plus bas que le précédent, de telle sorte qu'on puisse enlever le capuchon extérieur sans toucher à celui placé au-dessous (fig. 31).



Fig. 31. — Bocal pour recueillir le sang.

La partie droite du premier capuchon a été supprimée pour montrer le second capuchon.

Les flacons ainsi préparés sont stérilisés au four Pasteur;

4° Des matras de Chamberland et des tubes à essai stériles.

Opération. — On recueille d'ordinaire le sérum sur un cheval ou sur un âne; dans ce cas l'animal est laissé debout, on peut au besoin lui couvrir les yeux et le maintenir au moyen d'un serre-nez.

Si l'on utilise un bovidé, il sera avantageux de coucher l'animal sur la table à inoculations vaccinales. On devra s'adresser de préférence à un animal à jeun.

1° Opérer comme si l'on voulait pratiquer la saignée de la jugulaire. Faire comprimer et saillir la veine du cou; au-dessus du point comprimé, sur le trajet du vaisseau, pratiquer au bistouri une petite incision longitudinale de la peau.

2° Par l'incision, enfoncer le trocart entre la veine et la peau sur une longueur de 2 centimètres environ, puis piquer la veine et y faire pénétrer le trocart parallèlement à l'axe du vaisseau.

3° La canule restant en place, retirer le trocart et y substituer l'ajutage métallique portant le tube de caoutchouc; pendant ce temps l'aide comprime la veine un peu au-dessus de la canule et empêche le sang de s'écouler. Faire vite.

4° Le tube de caoutchouc mis en place est comprimé entre le pouce et l'index de la main gauche de l'opérateur, l'aide cesse la pression au-dessus de la canule, mais continue toujours à comprimer au-dessous.

5° Un second aide approche le flacon stérilisé, détache et soulève le capuchon extérieur, enfonce le tube de verre terminant le caoutchouc à travers le deuxième capuchon; les doigts de l'opérateur cessent de comprimer le tube et le sang s'écoule dans le flacon.

Le premier flacon étant aux trois quarts plein, l'opérateur comprime à nouveau le tube de caoutchouc, l'aide retire du col du flacon l'ajutage de verre, recouvre rapidement le flacon avec le capuchon de papier et assujettit celui-ci autour du col. On opère de même pour emplir le deuxième flacon.

Un cheval peut ainsi fournir, sans que sa santé ultérieure en souffre, de 5 à 6 litres de sang; sur de jeunes génisses nous n'avons jamais retiré plus de 3 litres.

6° Les bocaux sont portés dans un endroit frais; au bout de trente-six heures le sérum surnage; il a une belle couleur citrine et est transparent. Aspirer purement le sérum avec un matras de Chamberland et le répartir immédiatement dans des tubes stérilisés comme il a été dit page 48.

C. **Appareil de Latapie.** — Usage recommandé. — Cet appareil simplifie la technique du procédé de Roux et Nocard; il permet d'éviter toute contamination et assure un rendement en sérum de 700 centimètres cubes environ par litre de sang, au lieu du rendement ordinaire de 400 à 450 centimètres cubes.

Description. — Il se compose d'un flacon de plusieurs litres de capa-

cité, à large goulot, fermé par un bouchon en caoutchouc B, percé de trois trous (fig. 32). Dans le flacon, on dépose une certaine quantité de tiges de verre creuses, ouvertes aux deux bouts et percées de nombreux trous. Le bouchon perforé reçoit trois tubes ; le premier, *a*, est destiné à l'entrée du sang. Un ajutage en caoutchouc relie son extrémité libre au trocart de Nocard ; le tube *b* assure la communication avec l'air atmosphérique, son extrémité supérieure est munie d'un tampon d'ouate, son extrémité inférieure pénètre assez profondément dans le flacon et est fortement recourbée ; le tube *c*, enfin, sert à l'écoulement du sérum, son extrémité inférieure recourbée s'arrète à quelques centimètres du bouchon, son extrémité supérieure est reliée par un ajutage de caoutchouc à un tube de verre effilé et scellé à la lampe ; une pince à pression peut être placée sur le caoutchouc, en *p*, et intercepte toute communication entre les deux segments de tube de verre. Enfin l'appareil est disposé sur un support spécial, non représenté dans la figure, et qui permet de l'incliner à volonté de telle sorte que le goulot se trouve dirigé en haut ou en bas (1).

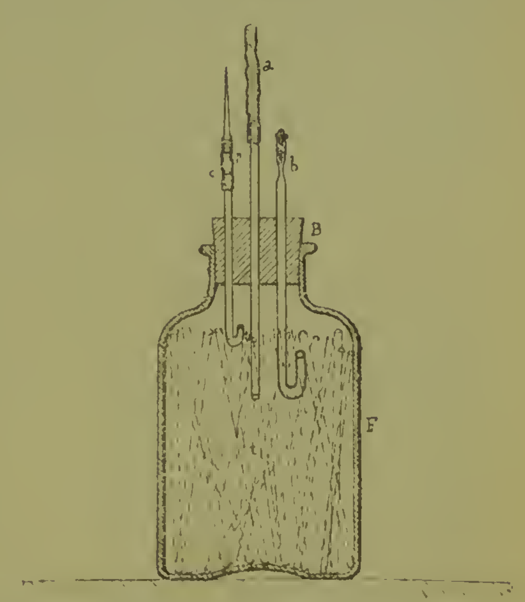


Fig. 32. — Appareil de Latapie pour la récolte du sérum (grands animaux).

Opération. — 1° L'appareil est stérilisé à l'autoclave Avoir soin d'humecter l'ouate du tube *b*, d'envelopper le flacon dans du papier filtre et de chauffer lentement. Après stérilisation et refroidissement luter le bouchon à la paraffine.

2° Faire la ponction veineuse comme dans le procédé de Roux et Nocard ; relier la canule au tube *a*. Laisser le sang s'écouler dans le flacon en ne le remplissant qu'à demi sans atteindre l'extrémité du tube à air *b*. Fermer le tube d'introduction avec une pince à pression. (Le flacon est placé le goulot en haut pendant toute cette partie de l'opération.)

3° Laisser reposer l'appareil pendant douze heures pour permettre la formation du caillot.

(1) Nous décrirons au chapitre XI un appareil du même auteur utilisable pour la récolte du sérum chez les petits animaux.

4° Le caillot formé et rétracté autour des baguettes de verre, incliner doucement l'appareil sur le support de façon à placer le goulot vers le bas ; le sérum tombe dans la partie du flacon voisine du goulot.

5° Placer une pince à pression en p, briser la pointe de l'effilure et enfoncer celle-ci dans le vase stérile où l'on désire recueillir le sérum. Enlever la pince, le sérum s'écoule. On arrête ou modère à volonté l'écoulement du sérum à l'aide de la pince.

L'orifice intérieur du tube d'écoulement étant à quelque distance du bouchon, il reste dans le flacon un peu de sérum contenant les globules rouges précipités ; la courbure du tube empêche ces globules d'être entraînés pendant l'écoulement du sérum.

GÉLATINISATION DU SÉRUM.

Le sérum a la propriété de se coaguler par la chaleur ; pour lui conserver sa transparence il faut opérer cette coagulation ou

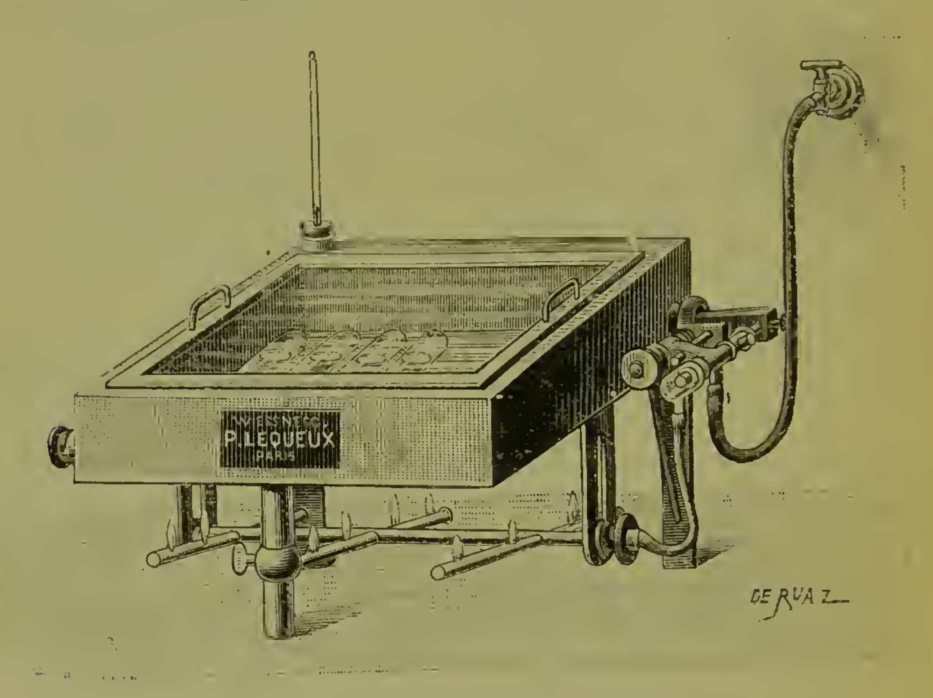


Fig. 33. — Étuve pour coaguler le sérum.

gélatinisation entre 68 et 70° ; pour que la solidification soit complète, il faut maintenir cette température pendant deux à trois heures.

On donne au sérum, dans les tubes, une disposition en plan incliné semblable à celle qui est adoptée pour la gelose. Pour opérer la gélatinisation on utilise d'ordinaire l'*appareil de Koch modifié* (fig. 33).

Cet appareil se compose d'une boîte rectangulaire en cuivre, à

double paroi et montée sur des pieds permettant de lui donner une inclinaison plus ou moins accentuée sur l'horizontale. La double paroi est remplie d'eau ; l'espace intérieur reçoit une couche mince de sable sur laquelle sont couchés les tubes de sérum ; un thermomètre est placé à côté des tubes. A sa partie supérieure la boîte est fermée par un couvercle mobile composé de deux lames de verre fixées dans un cadre métallique et séparées par une mince couche d'air. Une rampe à gaz est disposée sous l'appareil ; le gaz, pour s'y rendre, traverse un régulateur de Roux immergé dans l'eau de la double paroi ; on conduit l'opération ainsi qu'il suit :

1° Les tubes contenant environ 10 centimètres cubes de sérum sont couchés sur le sable ; l'inclinaison de l'appareil doit être telle que le sérum ne touche pas les bouchons d'ouate des tubes.

2° Allumer le gaz ; quand le thermomètre intérieur atteint 68°, régler l'appareil (Voy. chap. IV) de façon à maintenir la température à ce degré.

3° La durée de la chauffe nécessaire pour obtenir la solidification complète varie (de deux à trois heures) avec les différents échantillons ; il faut surveiller la marche de l'opération en retirant de temps en temps un tube pour examiner le degré de coagulation. La gélatinisation est achevée quand on peut redresser le tube sans que le sérum perde sa position en plan incliné. Cesser alors de chauffer. Le sérum gélatinisé doit avoir conservé une teinte jaune ambré et être transparent.

4° Avant de mettre les tubes en service, s'assurer qu'ils ne sont pas contaminés, par une observation de trente-six heures à l'étuve à 30°.

Quand on ne veut gélatiniser qu'un petit nombre de tubes de sérum on peut se passer de l'appareil de Koch. On dispose alors les tubes dans une petite boîte plate en cuivre d'environ 12 centimètres de largeur et dont une

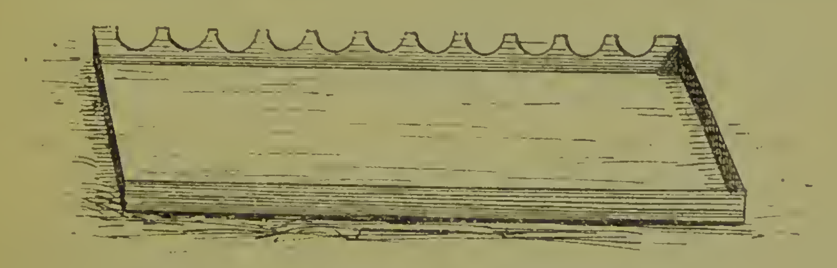


Fig. 34. — Plateau pour coaguler le sérum.

des parois porte des encoches destinées à recevoir l'extrémité supérieure des tubes : ceux-ci, dont le fond repose sur la paroi inférieure de la boîte, sont ainsi maintenus en position inclinée ; on couvre avec une lame de

verre et dispose le tout sur une casserole pleine d'eau que l'on porte à l'ébullition ; il faut une heure ou deux pour opérer la gélatinisation.

SÉROSITÉ DES ÉPANCHEMENTS.

Les épanchements pleurétiques stériles (pleurésie franche) fournissent souvent un sérum très clair bien coagulable et que l'on peut, dans certains cas, utiliser comme milieu de culture.

Pour recueillir purement cette sérosité, opérer comme pour les ponctions ordinaires, en employant un appareil de Potain préalablement stérilisé : le trocart est bouilli ; le bouchon en caoutchouc et le tube d'aspiration sont portés à 115° à l'autoclave ; le flacon est flambé au four Pasteur. On distribue ensuite le sérum dans des tubes stériles avec un matras de Chamberland. On peut obtenir ainsi du sérum absolument pur ; cependant, il est le plus souvent nécessaire de tyndalliser le liquide avant de le coaguler (opérer comme plus haut).

Les épanchements ascitiques ne fournissent d'ordinaire qu'un sérum mal coagulable et par conséquent inutilisable comme milieu de culture solide.

SÉRUM GLYCÉRINÉ.

En mêlant 6 à 8 p. 100 de glycérine pure au sérum on obtient un milieu excellent pour la culture du bacille de la tuberculose.

1° Aspirer dans un matras de Chamberland flambé 6 à 8 grammes de glycérine pure préalablement stérilisée à l'autoclave.

2° Aspirer ensuite dans le matras 100 centimètres cubes de sérum liquide stérile (pour faciliter cette opération on peut jauger préalablement le matras).

3° Répartir en tubes ; gélatiniser à 75°, ce sérum ne se coagulant qu'à une température plus élevée que le sérum ordinaire.

SÉRUM DE LÖFFLER.

1° Préparer suivant le mode ordinaire un bouillon avec :

Eau	1 000 grammes.
Viande de bœuf	500 —
Peptone	20 —
Sel marin	5 —
Glycose	10 —
Solution de soude	Q. S. pour légère alcalinité.

2° Aspirer dans un matras de Chamberland une partie de ce bouillon et trois parties de sérum liquide stérile.

3° Répartir le mélange en tubes ; gélatiniser à 70°-75°.

AGAR-SÉRUM. AGAR-ASCITE.

1° Dans 100 centimètres cubes d'eau faire dissoudre à chaud 1gr,5 de gélose. Filtrer. Répartir en tubes (5 centimètres cubes environ par tube). Stériliser à 120°.

2° Laisser refroidir les tubes à 40° ; dans chaque tube ajouter un volume de sérum ou de sérosité ascitique stériles égal au volume de gélose. Mélanger doucement en faisant tourner le tube entre les mains ; laisser refroidir en plan incliné.

AGAR-SANG (1) (BESANÇON ET GRIFFON).

1° Prendre un certain nombre de tubes de gélose glycérinée ; liquéfier la gélose au bain-marie et laisser refroidir à 40°.

2° Dans chaque tube recevoir une petite quantité (environ 1 centimètre cube) de sang au sortir de l'artère d'un lapin (technique, chap. XI. Opérer le mélange sans secouer le tube et laisser refroidir en plan incliné.

ŒUFS.

Les œufs peuvent être utilisés sous plusieurs formes :

A. — Prendre un œuf frais, le secouer violemment pour mélanger le blanc et le jaune ; laver la coquille au sublimé, puis l'essuyer avec un papier filtre stérilisé ; flamber le bout mince de l'œuf jusqu'à ce que la coquille noircisse, à ce niveau faire un trou avec une pointe métallique flambée ; par le trou introduire le fil de platine ou la pipette chargés du produit à ensemencer ; fermer le trou avec un peu de cire Golaz en fusion.

B. — Prendre un œuf frais, en flamber la pointe, y faire un trou comme il a été dit plus haut ; aspirer le blanc dans une pipette stérilisée ; répartir le liquide albumineux dans des tubes flambés. Coaguler à 70° comme le sérum.

C. — Faire cuire dur un œuf, puis l'éplucher et le couper en morceaux que l'on place dans de petits cristallisoirs à cloche ou dans des boîtes de Petri, et stériliser les cristallisoirs ou boîtes à 115°.

VIANDE.

Dans un flacon ou un matras de contenance de 1 litre mettre 500 à 600 grammes de viande de bœuf maigre finement hachée ; ajouter quelques centimètres cubes de solution de soude pour neutraliser ou alcaliniser faiblement. Boucher à l'ouate. Stériliser à 115°.

(1) Voy. aussi *Bac. de l'influenza.*

§ 4. — MILIEUX VÉGÉTAUX.

POMMES DE TERRE.

A. **Procédé de la boîte de Petri.** — 1° Choisir des pommes de terre très saines, les brosser avec soin sous un courant d'eau pour les débarrasser de toute trace de terre, les essuyer, les éplucher.

2° Couper des tranches perpendiculaires à l'axe du tubercule et épaisses de 10 à 15 millimètres, les jeter dans un grand cristallisoir plein d'eau distillée.

Éviter dans ces manipulations de toucher la surface des tranches avec les doigts : se servir, pour couper les tranches, d'un couteau à lame d'argent, le couteau d'acier noircissant souvent les surfaces de section.

3° Sécher les tranches entre deux doubles de papier à filtrer blanc.

4° Placer les tranches dans des boîtes de Petri (fig. 37) ou dans des petits cristallisoirs à couvercle.

5° Stériliser le tout à 120° pendant vingt minutes.

Il faut stériliser à 120°, car la surface du tubercule contient un microbe très résistant (Bac. de



Fig. 35. — Morceaux de pomme de terre pour culture en tube.



Fig. 36. — Tube pour culture sur pomme de terre.

la pomme de terre) et le couteau entraîne toujours quelques-uns de ces germes sur les surfaces de section.

B. **Procédé recommandé.** — 1° Laver et brosser des pommes de terre comme dans le procédé ci-dessus.

2° Les pommes de terre sont coupées, non plus en tranches, mais

en morceaux affectant la forme de parallélipipèdes allongés ou de demi-cylindres longs de 4 à 5 centimètres de manière à pouvoir être placés dans des tubes spéciaux dits tubes à pomme de terre ou tubes de Roux.

Ces tubes sont de diamètre un peu supérieur à celui des tubes employés couramment pour les cultures ; ils portent vers leur quart inférieur un étranglement sur lequel repose la pomme de terre : dans l'ampoule inférieure se réunit l'eau de condensation.

Il est commode pour découper les pommes de terre d'utiliser un emporte-pièce spécial qui donne des morceaux plus élégants et plus réguliers. Ne pas faire les morceaux trop longs, sans quoi ils s'incurvent en cuisant.

3° Laver les morceaux à l'eau distillée ; les essuyer sur un papier filtre.

4° Les placer dans les tubes ; boucher à l'ouate.

5° Stériliser comme plus haut.

REMARQUE. — Les pommes de terre sont ordinairement de réaction neutre, on en rencontre parfois de fortement acides, sur lesquelles les bactéries ne peuvent se développer. Si l'on se trouvait dans l'obligation d'utiliser ces pommes de terre acides on en ferait tremper les morceaux, pendant quelques heures avant la stérilisation, dans une solution de soude à 5 p. 1 000.

C. **Purée de pommes de terre.** — 1° Éplucher des pommes de terre, les couper en quartiers, les faire cuire à l'eau.

2° Les passer au presse-purée.

3° Répartir la purée en couches de 1 à 2 centimètres d'épaisseur dans des boites de Petri ou des cristallisoirs à couvercle.

4° Stériliser vingt minutes à 120°.

GELÉE D'AMIDON.

Délayer 10 grammes de fécule de pomme de terre dans 180 grammes d'eau ; ajouter 5 grammes de carbonate de chaux précipité ; répartir dans des flacons d'Erlenmeyer ou dans des boites de Petri ; stériliser à 115° ; lorsque l'empois est refroidi, il forme sur le fond des vases une couche blanchâtre homogène.

PAIN.

A. — Des tranches de pain blanc imbibées d'eau distillée sont placées dans des cristallisoirs à couvercle et stérilisées à 115° pendant vingt minutes.

B. — 1° Prendre de la mie de pain blanc, l'émietter, la faire sécher à l'air entre deux feuilles de papier filtre.

2° La poudre étant bien sèche, la moudre finement dans un moulin à café.

3° Disposer cette poudre en couches de 1 à 2 centimètres d'épaisseur dans des boîtes de Petri, de Soyka, ou des flacons d'Erlenmeyer; ajouter de l'eau distillée en quantité suffisante pour imbiber

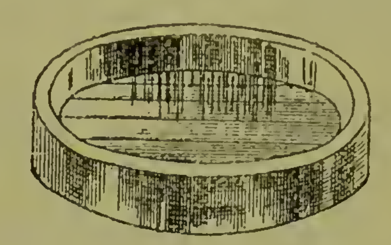
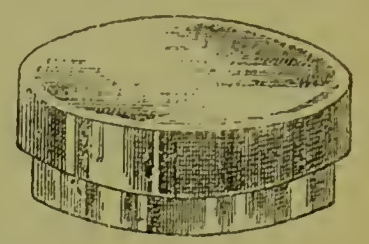



Fig. 37. — Boites de Petri.

toute la couche (en poids, environ deux parties et demie pour une partie de pain).

4° Stériliser à 115° pendant vingt minutes.

LAIT DE RIZ.

1° Mélanger intimement :

Lait	150	grammes.
Bouillon peptonisé	50	—
Riz en poudre	100	—

2° Répartir le mélange, dans des boîtes de Soyka, en couches de 1 à 2 centimètres d'épaisseur.

3° Porter à 115° pendant vingt minutes, le mélange se solidifie et forme une couche blanc opaque.

§ 5. — MILIEUX COLORÉS.

On emploie les milieux colorés pour le diagnostic de certains microbes qui y produisent, en se développant, des changements de coloration.

On n'utilise guère aujourd'hui que les milieux colorés à l'aide du tournesol bleu et additionnés d'une matière sucrée : les microbes qui fabriquent des acides aux dépens de cette substance font virer le tournesol au rouge.

Préparation de la teinture de tournesol. — On pulvérise le tournesol en pains, on le fait bouillir avec de l'alcool à 85° qu'on jette ensuite ; on arrose le résidu avec six à huit parties d'eau, on chauffe, on filtre et on conserve le liquide dans un flacon fermé par un tampon de coton. A la moitié de cette teinture on ajoute de

l'acide sulfurique étendu jusqu'à ce que la coloration soit presque rouge, et on réunit à l'autre moitié pour avoir la teinture sensible. Cette teinture sensible est répartie dans des tubes bouchés à l'ouate et stérilisée à 115°.

GÉLATINE LACTOSÉE AU TOURNESOL.

1° Préparer de la gélatine lactosée de la même façon que la gélatine ordinaire, mais en ajoutant (temps 4) 2 à 4 p. 100 de lactose; répartir en tubes; stériliser.

2° Préparer des tubes de tournesol stérilisés.

3° Au moment du besoin, liquéfier la gélatine au bain-marie et y ajouter avec une pipette stérile une quantité de teinture de tournesol suffisante pour obtenir une teinte bleue franche.

Ne jamais stériliser les milieux préalablement colorés: la teinte bleue disparaîtrait par le chauffage.

Préparer de même la gélatine glucosée, mannitée, etc., et aussi les géloses au tournesol.

LAIT AU TOURNESOL.

Additionner du lait stérile d'une quantité suffisante de teinture de tournesol stérilisée.

MILIEU DE NŒGGERATH.

1° Mélanger, dans les proportions suivantes, des solutions aqueuses saturées des couleurs d'aniline ci-dessous indiquées :

Bleu de méthyle................	2 centimètres cubes.
Violet de gentiane..............	4 —
Vert de méthyle...............	1 centimètre cube.
Chrysoïdine.....................	4 centimètres cubes.
Fuchsine.........................	3

2° Ajouter 200 centimètres cubes d'eau distillée.

3° La solution a une teinte neutre, gris bleu; la laisser reposer quinze jours, puis si sa coloration s'est modifiée, la ramener à la teinte primitive en y ajoutant, suivant le cas, du bleu, du vert, du rouge, etc. Stériliser à 100°.

4° Au moment du besoin on ajoute 7 à 10 gouttes du mélange stérilisé dans un tube de gélatine ou de gélose ordinaires liquéfiées au bain-marie.

Gasser a substitué à ce mélange l'usage d'une solution aqueuse saturée de fuchsine, que l'on stérilise à l'autoclave et dont on ajoute 20 gouttes à un tube de gélose liquéfiée.

L'usage de ces milieux, recommandés par leurs auteurs pour la diagnose du bacille d'Eberth, est tombé en désuétude (Voy. aussi *Bacille typhique*).

CHAPITRE III

ENSEMENCEMENT ET DISPOSITION DES CULTURES AÉROBIES

Les cultures des microbes aérobies doivent être contenues dans des vases permettant l'accès de l'air, mais les protégeant contre les poussières atmosphériques.

Les vases de culture peuvent être variés : tubes à essai, matras Pasteur, fioles diverses, cristallisoirs de Petri, boîtes de Soyka, etc.

Les bouchons d'ouate, les capuchons de papier, les cloches en verre sont les moyens de protection les plus ordinairement employés.

Tout ensemencement sera pratiqué selon les règles suivantes :

1° *Utiliser pour prélever la semence un instrument stérile ;*

2° *Prélever purement la semence ;*

3° *Reporter purement la semence dans le milieu à ensemencer.*

Article I. — **INSTRUMENTATION.**

Les instruments utilisés pour les ensemencements sont la *pipette Pasteur*, le *fil de gélatine*, l'*aiguille de verre*.

A. **Pipette Pasteur.** — La pipette Pasteur se compose d'un tube de verre de 5 à 7 millimètres de diamètre intérieur, effilé et fermé à la lampe à une de ses extrémités, ouvert et muni d'un tampon d'ouate à l'autre; la pipette a une longueur totale de 20 à 25 centimètres.

On aura toujours une provision de pipettes préparées d'avance.

Fabrication. — 1° Prendre un tube de verre de 5 à 7 millimètres de diamètre intérieur; avec le couteau à verre y pratiquer des traits déterminant des fragments de 25 centimètres environ de longueur (le tube de verre que l'on trouve dans le commerce a environ 1 mètre de long et fournit 4 fragments).

2° Séparer les fragments en rompant le tube tenu entre les mains.

les pouces étant appuyés de part et d'autre de chaque côté du trait du couteau.

3° Passer les deux extrémités de chaque fragment dans la flamme du chalumeau à gaz pour émousser les arêtes de section.

4° Munir les deux extrémités de chaque tube d'un petit tampon d'ouate enfoncé complètement dans le tube qui doit le déborder de quelques millimètres (fig. 38); pour cela enfoncer dans le tube un



Fig. 38. — Préparation des pipettes de Pasteur.

fragment d'ouate en serrant modérément à l'aide d'une pointe mousse (l'extrémité effilée d'un tiers-point convient très bien).

5° Porter la partie médiane du tube ainsi préparé dans la flamme d'un chalumeau (flamme moyenne), ramollir le verre en tournant constamment le tube entre les pouces et les index; quand le verre est devenu malléable, sortir rapidement le tube de la flamme et l'étirer de façon à produire une effilure longue d'environ 30 centimètres (fig. 38, A). Couper l'effilure par le milieu dans la pointe de la flamme du chalumeau : on obtient ainsi deux pipettes dont les extrémités effilées se trouvent scellées.

Cette manipulation exige un certain tour de main. Avoir soin d'étirer le tube en position bien rectiligne : pour cela, les coudes de l'opérateur doivent être appuyés sur la table. Toujours étirer hors de la flamme; ne pas produire une effilure trop mince et par conséquent trop fragile.

6° Les pipettes ainsi préparées sont placées dans un panier en toile métallique, leur grosse extrémité reposant sur le fond du panier, et stérilisées à 180° dans le four Pasteur. Elles sont alors prêtes à servir.

Utilisation. — 1° Casser, avec une pince à dissection ou entre l'ongle du pouce et la pulpe de l'index, l'extrémité scellée de l'effilure.

2° Passer dans la flamme d'un bec Bunsen ou d'une lampe à alcool l'effilure de la pipette pour détruire les germes qui ont pu se déposer à la surface.

3° Plonger l'extrémité de cette effilure dans le liquide à ensemencer, celui-ci monte dans le tube par capillarité ou par une aspiration pratiquée avec la bouche à l'autre extrémité de la pipette.

Dans cette manœuvre avoir soin que le liquide aspiré n'atteigne pas le bouchon d'ouate de l'orifice supérieur de la pipette.

4° Porter rapidement la pointe de la pipette au contact du milieu à fertiliser et y laisser tomber — par l'action de la pesanteur ou en soufflant légèrement par l'orifice supérieur — une ou plusieurs gouttes du liquide semence.

5° On peut conserver indéfiniment à l'abri de toute contamination le liquide aspiré dans la pipette ; pour cela on porte l'extrémité effilée dans une petite flamme (veilleuse du bec de Bunsen par exemple) en inclinant un peu la pipette pour que le liquide reflue vers la partie large ; quand le verre est ramolli par la chaleur on étire avec une pince à dissection, jusqu'à fermeture complète, l'extrême pointe de l'effilure.

B. **Fil de platine.** — Le fil de platine doit être préféré à tout autre fil métallique à cause de son inaltérabilité qui permet de le porter au rouge sans en produire l'oxydation. Par suite de sa grande conductibilité il ne peut être tenu avec les doigts, il faut l'emmancher avant de l'utiliser.

Le fil de platine ainsi emmanché, *öse* des Allemands, répond à tous les besoins. On trouve dans le commerce trois types de fil, le gros, le moyen, le fin ; chacune de ces sortes de fil trouve son utilisation.

Le fil de platine fin est le plus commode, car il se refroidit très rapidement, ce qui est une condition importante de réussite dans la pratique des ensemencements ; mais il est très peu résistant, très flexible et ne convient pas pour prélever une culture adhérente sur milieu solide ou ensemencer un milieu rugueux, tel que la pomme de terre.

Fig. 39. — Öses de platine.

En pratique, il faudra toujours avoir à portée de la main :

Un fil de platine fin, rectiligne, pour les ensemencements par piqûre ;

Un fil fin, terminé en boucle, pour prélever une goutte.

Un fil moyen, que l'on peut courber à angle droit près de son extrémité ;

Un fil gros dont l'extrémité est écrasée en forme de spatule.

Préparation de l'öse. — 1° Prendre une baguette de verre de 5 à 7 millimètres de diamètre, la diviser en fragments de 20 à 25 centimètres de longueur (faire un trait au couteau à verre, puis rompre entre les doigts au niveau de ce trait).

2° Couper avec de forts ciseaux des morceaux de fil de platine longs de 5 à 7 centimètres.

3° Saisir de la main gauche un fragment de baguette, en ramollir une extrémité dans la flamme du chalumeau, en faisant constamment tourner la baguette entre les doigts. Pendant ce temps la main droite de l'opérateur tient, à l'aide d'une pince, le morceau de fil de platine à environ 15 millimètres d'une de ses extrémités, elle porte cette extrémité dans la flamme et la chauffe au rouge blanc.

4° Quand l'extrémité de la baguette de verre est ramollie, y introduire bien droit l'extrémité chaude du fil de platine et l'y faire pénétrer sur une longueur d'un centimètre et plus. Chauffer le tout quelques instants, puis laisser refroidir.

5° Porter rapidement l'autre extrémité de la baguette de verre dans la flamme pour en émousser l'arête tranchante.

6° Avec une pince à dissection, contourner en boucle, couder à angle droit, ou écraser avec un marteau, suivant le cas, l'extrémité libre du fil de platine.

Utilisation. — 1° Tenir la baguette de verre par son tiers supérieur, en passer très rapidement l'extrémité inférieure (où se trouve le fil de platine) dans la flamme d'un bec de Bunsen, pour détruire les germes déposés à la surface du verre.

Ce flambage doit être très rapide, la surface lisse du verre se stérilisant rapidement et ne devant d'ailleurs pas entrer en contact immédiat avec la culture; en chauffant trop fortement on risquerait de faire éclater le verre au point où est soudé le fil de platine.

2° Porter ensuite au rouge le fil de platine, le sortir de la flamme et le laisser quelques secondes à l'air pour qu'il refroidisse.

L'exposition du fil à l'air doit être limitée au temps strictement nécessaire à son refroidissement, sans quoi ce fil risquerait d'être souillé par les poussières atmosphériques; c'est pourquoi le fil fin, se refroidissant rapidement, est ordinairement employé.

3° Porter rapidement le fil de platine sur le produit à ensemencer, puis le faire pénétrer dans le milieu à fertiliser.

4° L'ensemencement terminé, le fil de platine doit être porté au rouge pour être débarrassé des germes qui y sont restés adhérents.

Cette précaution est particulièrement indispensable quand on manie les microbes pathogènes; si on omettait de la prendre on souillerait la table et les divers objets au contact desquels pourrait se trouver l'öse.

C. **Aiguille de verre.** — Étirer une baguette de verre de la même façon que l'on étire le tube dans la préparation des pipettes

Pasteur. Avec le couteau à verre, couper carrément, par son milieu, la partie effilée. On prépare ainsi des aiguilles aussi fines qu'on le désire.

Ces aiguilles, moins maniables que le fil de platine, ont sur celui-ci l'avantage d'être rigides : elles conviennent très bien pour pratiquer les ensemencements en piqûre profonde (gélatine).

Flamber ces aiguilles au moment de les utiliser.

Article II. — ENSEMENCEMENTS.

Les ensemencements peuvent être pratiqués à l'aide d'une culture préalable ou encore d'eau, de poussières, de sang, etc., mais toujours leur technique reste la même, seul le mode de *prélèvement* de l'échantillon à ensemencer varie avec les différentes substances. Nous apprendrons plus tard à faire ces divers prélèvements ; pour le moment supposons que nous ayons à pratiquer des ensemencements à l'aide d'une culture préalable et prenons comme type une culture en bouillon de la Bactéridie charbonneuse.

L'opération se décompose en trois temps :

I. Ouvrir le tube où doit être prélevée la semence.

II. Prélever la semence.

III. La reporter dans le milieu à fertiliser. Ici plusieurs cas peuvent se présenter ; on peut ensemencer :

a. En bouillon ou dans tout autre milieu liquide ;

b. En strie sur gélose, gélatine, sérum inclinés ou pomme de terre ;

c. En piqûre en gélatine ;

d. En colonies séparées (*isolement*) ; ce dernier cas fera l'objet d'un chapitre spécial.

A. **Ensemencements dans un milieu liquide**. — Nous prendrons le tube de bouillon comme type du milieu liquide.

1° Prendre un tube de bouillon stérilisé et le tube contenant la culture à réensemencer ; flamber le bouchon d'ouate qui ferme l'orifice de chacun de ces tubes pour détruire les poussières qui s'y sont déposées ; saisir successivement les bouchons entre le pouce et l'index de la main droite et les dégager légèrement en les tournant sur eux-mêmes par un mouvement de vrille.

2° Placer les deux tubes côte à côte dans la main gauche, dans une position presque horizontale, le fond des tubes reposant dans le creux de la main, leur partie postérieure étant maintenue entre le pouce, l'index et le médius.

3° Prendre entre l'index et le médius de la main droite l'öse (fil à boucle) et la flamber comme il a été dit.

4° Pendant que l'öse refroidit, saisir entre le pouce et la pulpe de l'index de la main droite le bouchon d'ouate du tube semence, enlever ce bouchon déjà dégagé en partie au temps 1. Conserver le bouchon entre le pouce et l'index.

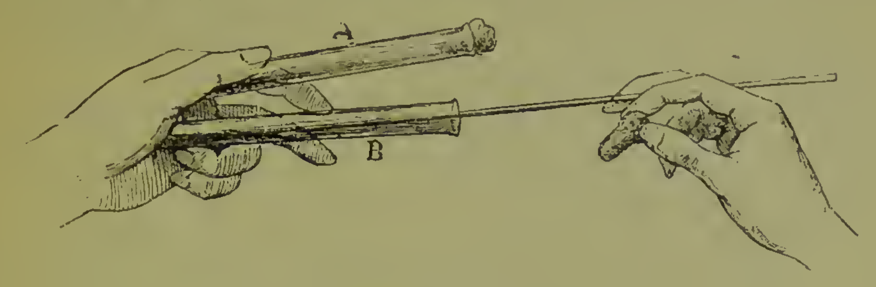


Fig. 40. — Ensemencement en milieu liquide.

5° Introduire rapidement l'öse dans le tube sans qu'elle touche les bords de l'orifice ; le fil de platine prélève une goutte de la culture et est vivement retiré du tube (fig. 40).

Immédiatement l'orifice du tube est porté dans la flamme pour détruire les germes qui auraient pu s'y déposer pendant le prélèvement et le bouchon d'ouate est remis en place.

6° Enlever de même le bouchon d'ouate du tube à fertiliser; plonger l'öse chargée de la semence dans le bouillon et la retirer rapidement. Flamber et reboucher l'orifice, comme précédemment.

7° Avant de déposer l'öse sur la table, la porter au rouge pour détruire les germes qui y adhèrent (Bactéridie charbonneuse, dangereuse pour l'homme, dans le cas actuel).

8° S'assurer de la fixité des bouchons d'ouate; placer sur le tube ensemencé une étiquette indiquant la nature de la culture et la date de l'ensemencement.

Il est souvent plus commode de coiffer l'orifice du tube, par-dessus le bouchon d'ouate, avec un petit capuchon que l'on prépare extemporanément en enroulant autour de la partie terminale du tube une petite bandelette de papier dont on tortille le bord supérieur; on inscrit sur cette bandelette les indications précédentes (fig. 41). Ce capuchon a en outre l'avantage de protéger le bouchon d'ouate de toute souillure.

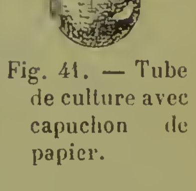


Fig. 41. — Tube de culture avec capuchon de papier.

Remarques. — Avoir soin de toujours tenir les tubes que l'on doit ouvrir, dans une position oblique, presque horizontale, pour y empêcher la chute des poussières atmosphériques. — Opérer très rapidement pour restreindre

les chances de contamination. — Ne jamais poser sur la table les bouchons d'ouate dont la partie qui pénètre dans les tubes doit être préservée de tout contact. — Le manche de verre de l'öse ne doit jamais toucher les milieux de culture.

B. **Ensemencements en strie.** — Nous décrirons comme type un ensemencement sur gélose inclinée :

1° Opérer comme il est dit en A en remplaçant le tube de bouillon stérile par un tube de gélose.

2°-3°-4°-5° Comme en A.

6° Le bouchon d'ouate du tube de gélose étant enlevé, l'opérateur porte l'extrémité du fil de platine sur la partie de la surface inclinée la plus voisine du fond du tube, puis la ramène vers l'orifice par un mouvement rectiligne ou légèrement sinueux en frottant la surface de la gélose.

7°-8° Comme en A.

Remarque. — Pour pratiquer les ensemencements sur pomme de terre opérer de même, en ayant soin d'appuyer fortement sur la pomme de terre en traçant la strie, se servir ici de l'öse avec fil de platine moyen ou gros.

C. **Ensemencements en piqûre.** — Nous décrirons un ensemencement en gélatine :

1° Comme en A en substituant au tube de bouillon stérile un tube de gélatine.

2° Les deux tubes sont disposés dans la main gauche de la façon suivante : le tube semence est placé dans le creux de la main et maintenu presque horizontalement entre le pouce et la pulpe de l'index ; le tube de gélatine est maintenu, serré entre la face dorsale de l'index et la face palmaire du médius, en position verticale, son orifice regardant en bas.

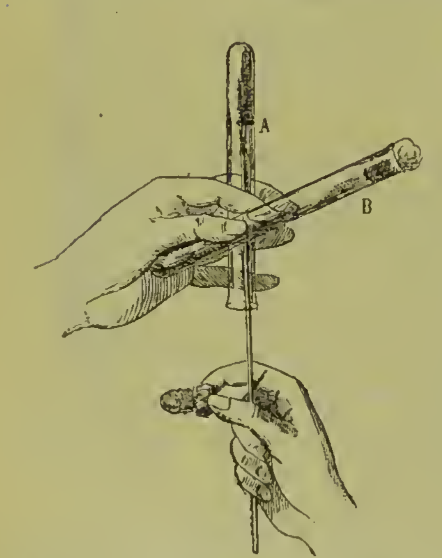


Fig. 42. — Ensemencement en piqûre.

3° Saisir l'*öse à fil rectiligne* à pleine main (main droite) de façon que le pouce et l'extrémité de l'index restent libres. Flamber l'öse.

4°-5° Comme en A.

6° Le bouchon du tube de gélatine est saisi, enlevé et conservé entre le pouce et la pulpe de l'index de la main droite; l'öse chargée de semence est présentée verticalement, de bas en haut, à l'orifice du tube, on pousse l'extrémité du fil de platine

jusqu'à la surface de la gélatine, puis on laisse le tube s'abaisser par son propre poids : la gélatine s'empale en quelque sorte sur le fil de platine; quand celui-ci touche le fond du tube, on le retire rapidement (fig. 42).

7°-8°-9° Terminer comme en A.

Remarques. — I. Il importe d'obtenir une piqûre bien droite atteignant le fond du tube et ne venant pas aboutir aux parois latérales; on y arriverait difficilement en *enfonçant* le fil dans la gélatine, la réussite est beaucoup plus aisée en laissant la gélatine *s'empaler* elle-même sur le tube; pour cette opération on ne peut tenir le tube en position oblique, force est donc de le renverser et de le maintenir vertical.

II. Quand les tubes ont été préparés depuis un certain temps, la gélatine se fendille, se crevasse; en pareil cas, il faut avoir soin, au moment de l'ensemencement, de liquéfier la gélatine au bain-marie, puis de la laisser se solidifier de nouveau : le milieu redevient ainsi homogène.

Article III. — CONDITIONS DE CULTURE.

Les tubes ensemencés doivent être maintenus :

A. — A l'abri des poussières atmosphériques et néanmoins au contact de l'air (bouchon d'ouate) ;

B. — A une température constante ;

C. — Autant que possible à l'abri de la lumière.

Pour réaliser les deux derniers desiderata, on se sert d'étuves que nous étudierons dans le prochain chapitre.

Certains microbes exigent pour se développer des températures supérieures à 30° (ordinairement 37° ou 38°), d'autres au contraire ne cultivent bien qu'au-dessous de 30°, enfin les cultures en gélatine ne peuvent être exposées à une température supérieure à 20° ou 22°.

Dans un laboratoire on devra donc posséder trois étuves : 1° l'une réglée à 20° (étuve à gélatine) ; 2° une autre réglée à 37°-38° ; 3° la troisième enfin servira suivant les besoins, tantôt pour les cultures qui exigent une température supérieure à 38° (39° à 41°), tantôt pour les cultures à des températures comprises entre 20° et 37°.

D. — Tous les microbes, enfin, n'utilisent pas indifféremment les divers milieux de culture; certains exigent des milieux riches en matières albuminoïdes, certains préfèrent les sucres, la glycérine, d'autres ne poussent pas sur le sérum, la pomme de terre, etc. Dans la technique spéciale nous indiquerons les milieux appropriés à la culture de chaque microbe.

ARTICLE IV. — EXAMEN DES CULTURES.

Les cultures sont examinées chaque jour une ou plusieurs fois; on note leurs caractères qui sont d'une grande utilité pour la détermination des bactéries ; les observations porteront sur les points suivants :

A. — CARACTÈRES COMMUNS A TOUS LES MILIEUX.

1° *Température optima de culture. — Températures limites.*
2° *Moment de l'apparition de la culture.*

B. — CARACTÈRES DES CULTURES EN MILIEUX LIQUIDES.

1° *Forme de la culture*; il peut exister :

a. Un trouble notable, uniforme, ou avec ondes soyeuses, ou avec voile à la surface. Dans ces différents cas il peut se produire à la longue des précipités floconneux. Noter leur présence ;

b. Pas de trouble notable. — α. Un voile à la surface : voile mince, voile épais, gras, rugueux. — β. Des anneaux sur la paroi du tube, à la surface du liquide. — γ. Des dépôts floconneux nageant dans le liquide et se précipitant à la longue. — δ. De fins dépôts grumeleux, tombant au fond ou adhérents aux parois du tube.

2° *Coloration de la culture.*

3° *Odeur de la culture.*

4° *Apparition de corps nouveaux* (toxines, indol, acides, ammoniaques composées, etc.).

5° Dans les cultures en *lait* noter s'il y a *coagulation.*

C. — CARACTÈRES DES CULTURES EN STRIE.

I. — GÉLOSE. — POMME DE TERRE. — SÉRUM.

1° *Forme de la culture.* — *a.* Culture localisée à la strie : α. strie mince, transparente, homogène ou constituée par des colonies distinctes; β. strie épaisse : humide, grasse, visqueuse, sèche, rugueuse ;

b. Culture s'étendant à toute la surface : humide, grasse, visqueuse, sèche, rugueuse.

2° *Coloration.* — Coloration de la strie, du milieu environnant.

3° *Odeur.*

II. — GÉLATINE.

1°-2°-3° Comme pour la gélose.

4° Noter s'il y a ou non *liquéfaction*, indiquer la date de la liquéfaction.

D. — CARACTÈRES DES CULTURES EN PIQURE (GÉLATINE).

1° *Forme de la culture.* — *a.* Culture rectiligne ;

b. Culture ramifiée, arborisée ;

c. Culture en clou : mince, épais, à tête plus ou moins accentuée ;

d. Culture limitée à la surface.

2° *Liquéfaction.* — *a.* Sa date ;

b. Sa forme cylindrique, en entonnoir, en doigt de gant ou en cupule ; elle reste partielle ou s'étend à toute la gélatine. — Noter s'il existe l'apparence d'une *bulle d'air* retenue au sommet de la culture.

3° *Coloration* de la culture, de la gélatine autour de la culture.

4° *Odeur.*

Article V. — CONSERVATION DES CULTURES.

Le développement terminé, les microbes de la culture peuvent conserver leur vitalité pendant un temps variable suivant les

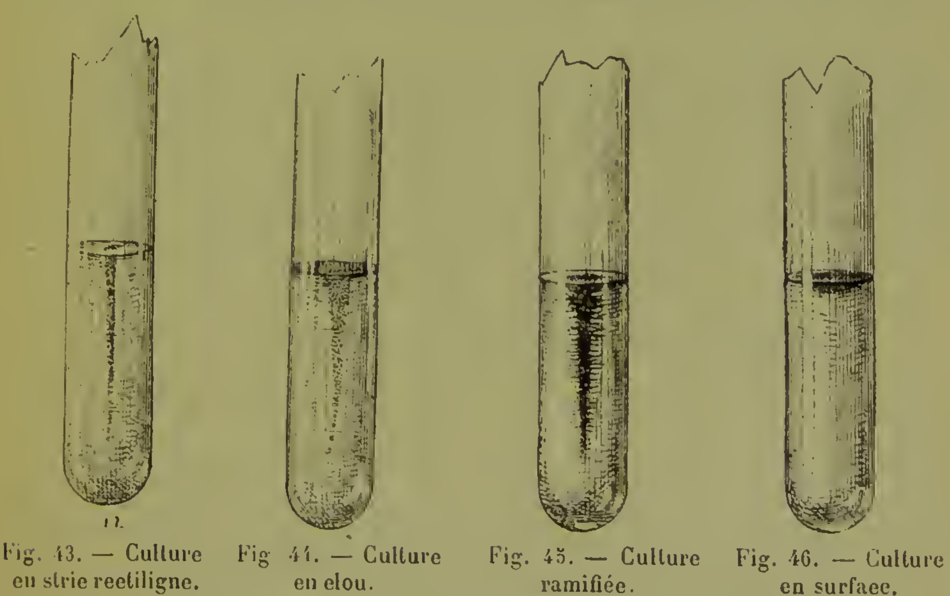


Fig. 43. — Culture en strie rectiligne. Fig. 44. — Culture en clou. Fig. 45. — Culture ramifiée. Fig. 46. — Culture en surface.

Cultures en piqûre sur gélatine (pas de liquéfaction).

espèces (de quelques jours à plusieurs mois et même des années), mais à la longue la culture finit par périr et n'est plus susceptible de fertiliser les milieux dans lesquels elle est réensemencée.

L'affaiblissement et la disparition de la vitalité sont dus en grande partie à l'action prolongée de l'oxygène de l'air sur la culture ; aussi pour conserver à un microbe sa vitalité faut-il avoir soin de le réensemencer fréquemment. On obtient le même résultat en soustrayant les cultures, une fois le développement terminé, à l'influence de l'air ; pour cela, on opère de la façon suivante :

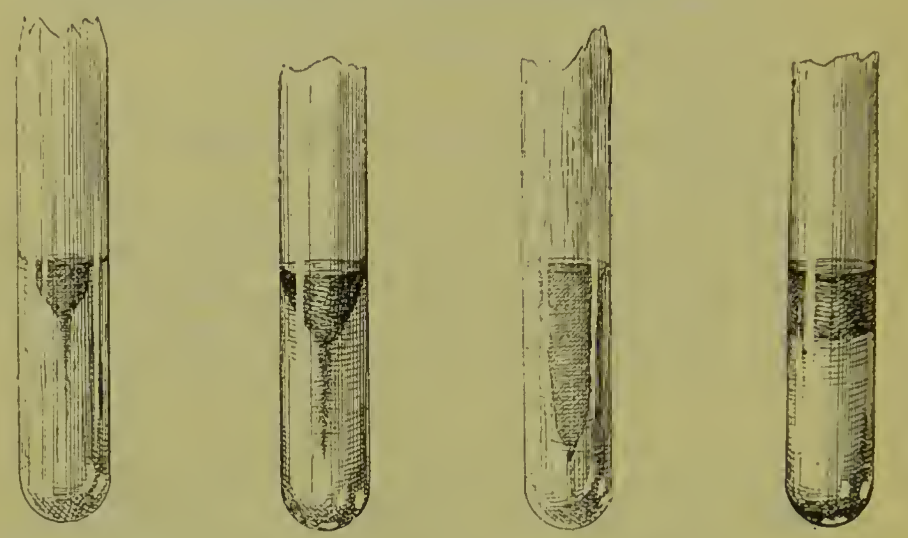


Fig. 47. — Liquéfaction en cupule. Fig. 48. — Liquéfaction en entonnoir. Fig. 49. — Liquéfaction en doigt de gant. Fig. 50. — Liquéfaction cylindrique.

Cultures en piqûre sur gélatine (liquéfaction).

1° Préparer une culture en bouillon et l'exposer à la température optima pendant le temps nécessaire à son développement (temps variable suivant les différents microbes) ;

2° Prendre une pipette Pasteur dont on porte sur une petite flamme de chalumeau la partie située immédiatement au-dessous

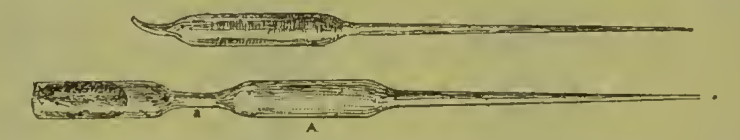


Fig. 51. — Préparation des ampoules pour la conservation des cultures à l'abri de l'air.

du tampon d'ouate; le verre étant ramolli, on l'étire légèrement de façon à produire un étranglement *a* (fig. 51) ;

3° On laisse refroidir la pipette, puis, avec les précautions ordinaires on en plonge l'effilure dans la culture et on aspire le liquide jusqu'à ce qu'il atteigne l'étranglement *a* ;

4° Porter rapidement la pipette sur la petite flamme du chalumeau et la sceller en *a* et à la pointe : on obtient un petit tube fermé aux deux extrémités et entièrement rempli par la culture. Conserver à l'abri de la lumière.

CHAPITRE IV

LES ÉTUVES

Le but des étuves est de maintenir les cultures à une température favorable à leur développement.

La *forme* de l'étuve importe peu, d'une manière générale, et doit seulement être appropriée aux dimensions des objets que l'appareil est destiné à contenir. Les étuves de forme rectangulaire sont les plus commodes ; ce sont celles qui permettent d'utiliser le plus complètement la capacité de l'appareil.

On conçoit qu'une caisse métallique munie d'une porte et chauffée par un brûleur quelconque, puisse, à la rigueur, être utilisée comme étuve : une boîte rectangulaire en cuivre ou en fer-blanc montée sur pieds et chauffée par une veilleuse à huile, plus ou moins éloignée du fond de l'appareil suivant la température à obtenir, peut constituer une étuve. Mais avec un tel appareil il est malaisé d'obtenir une température constante : indépendamment de la quantité de chaleur fournie par le brûleur, la température de l'étuve est fonction de la température extérieure. Force a donc été de recourir à des appareils plus compliqués, plus coûteux, mais plus précis.

Deux principes doivent présider à la construction d'une étuve :

1° *Soustraire autant que possible l'appareil aux variations de la température extérieure et réduire au minimum la déperdition de chaleur par rayonnement et par convection ;*

2° *Munir l'étuve d'un régulateur de température automatique aussi sensible que possible.*

Les premiers desiderata seront réalisés en entourant l'étuve d'une paroi isolante (bois, feutre, couche d'eau comprise entre deux parois métalliques) ou d'une feuille de cuivre soigneusement polie, les métaux polis ayant la propriété de rayonner très faiblement.

Les *régulateurs* sont très nombreux ; les uns, les seuls recommandables, sont applicables au chauffage par le gaz (1) ; les autres, au

(1) Le bon fonctionnement des régulateurs exige une pression constante du gaz qui les alimente ; pour obtenir cette constance, il est bon de faire usage d'un régulateur de pres-

chauffage par les divers combustibles; nous ne décrirons que les modèles les plus ordinairement employés.

Une condition indispensable au bon fonctionnement d'une étuve est la *ventilation*. Si l'étuve est constituée par une caisse hermétiquement close, on conçoit que l'air chaud s'accumule à la partie supérieure : il en résulte des variations notables de la température aux différents étages de l'étuve. Il importe de ménager à la partie inférieure et au plafond de l'étuve des trous d'aération permettant la production d'un courant d'air ascendant qui égalise sensiblement la température aux différentes hauteurs de l'appareil.

Article I. — ÉTUVES CHAUFFÉES AU GAZ.

ÉTUVE DE BABÈS.

Une caisse métallique, protégée par une enveloppe de feutre et chauffée par un brûleur muni d'un régulateur, constitue la plus simple de toutes les étuves; telle est l'*étuve de Babès* (fig. 52) à laquelle on peut adapter plusieurs sortes de régulateurs.

A. **Régulateurs électriques**. — Type : *régulateur de Babès*. — Appareils très compliqués, de fonctionnement aléatoire, ne présentant aucun avantage sur les suivants.

B. **Régulateurs à mercure**. — Type : *régulateur de Chancel*. — Le gaz arrive par le tube en verre A (fig. 53), vient sortir par le bec de flûte qui termine ce tube à l'intérieur du régulateur et passe par l'ajutage B pour se rendre au brûleur. L'appareil étant disposé dans l'étuve, le mercure placé dans la partie inférieure, en R, se dilate sous l'influence de toute élévation de température et vient obstruer plus ou moins complètement le bec de flûte, diminuant ainsi la quantité de gaz qui se rend au brûleur; un trou de sûreté, O, évite l'extinction du gaz en cas d'occlusion complète du bec de flûte.

Dès que l'étuve se refroidit, le niveau du mercure baisse et le gaz passe librement. Une vis, V, permet de régler l'appareil en augmentant ou diminuant la capacité du tube plein de mercure. Appareil peu coûteux, mais peu sensible.

C. **Régulateurs à éther**. — Type : *régulateur de Rohrbeck*. — Cet appareil est basé sur les modifications de tension de la vapeur d'éther sous l'influence des changements de température. La figure 54 fait comprendre son fonctionnement.

Le gaz arrivant par l'ajutage A passe par le bec de flûte et se rend

sion (celui de Moitessier, par exemple), placé à l'origine de la conduite sur laquelle sont branchées les étuves.

au brûleur par B ; à la partie inférieure du tube T une cloison en verre, en forme d'entonnoir, E, délimite une chambre R, dont la partie inférieure contient du mercure et la partie supérieure des vapeurs d'éther. Toute élévation de la température ambiante augmente la tension des vapeurs d'éther, le mercure refoulé monte dans l'entonnoir et vient obstruer plus ou moins le bec de flûte et

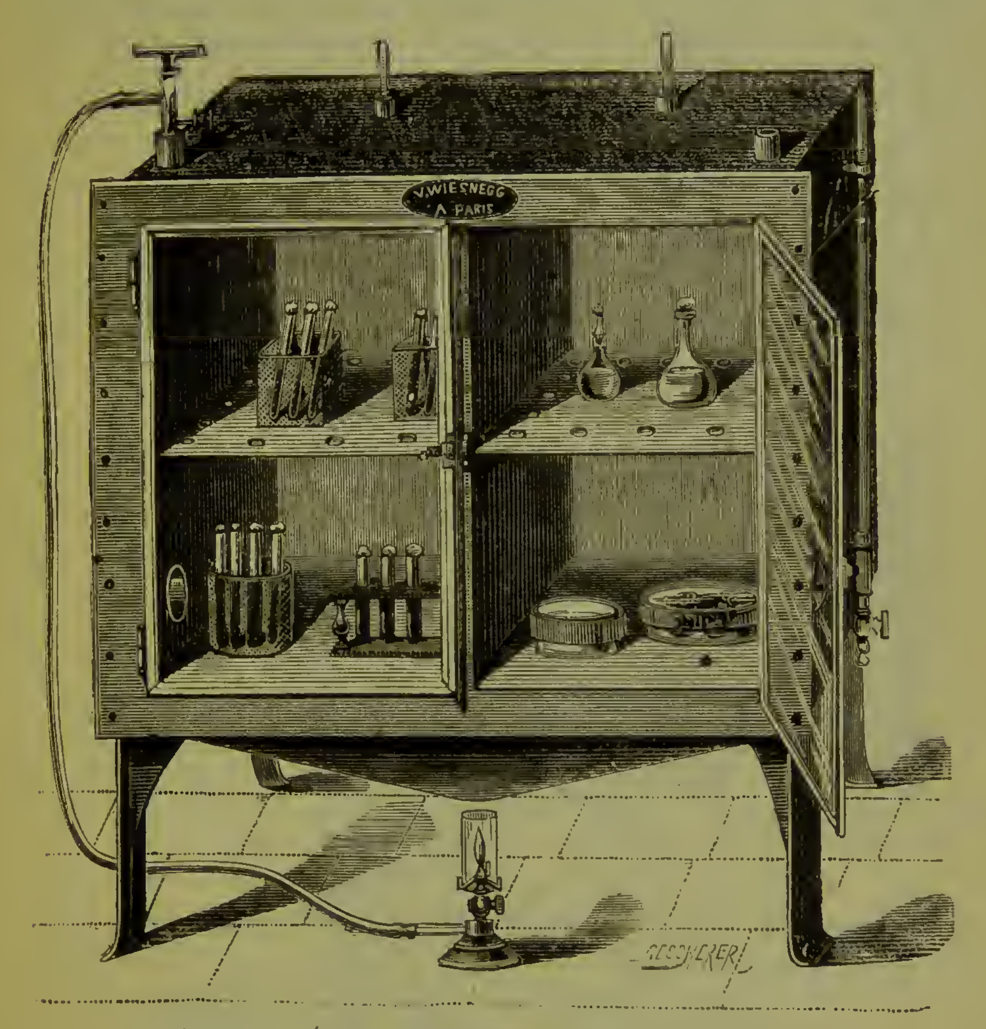


Fig. 52. — Étuve de Babès avec régulateur de Chancel.

diminuer ainsi l'afflux du gaz au brûleur. Un trou de sûreté O empêche l'extinction totale. On règle l'appareil en enfonçant plus ou moins le tube A dans le bouchon. Appareil sensible, mais fragile.

D. **Régulateurs à air**. — Type : *régulateur de Bohr* (fig. 53). — Le principe de l'appareil est le même que celui du précédent, la vapeur d'éther étant remplacée par de l'air.

Le régulateur est placé dans l'étuve, le réservoir A étant plein d'air, le robinet R ouvert. Quand l'étuve a atteint la température

désirée, on ferme R. Toute nouvelle élévation de température détermine la dilatation de l'air du réservoir, l'air dilaté refoule le mercure contenu en B : le bec de flûte C est plus ou moins obstrué et l'afflux du gaz au brûleur diminué. Un trou de sûreté, O, empêche l'extinction totale. Cet appareil est sensible, mais présente l'inconvénient d'être influencé par les variations de la pression atmosphérique; il exige une certaine surveillance.

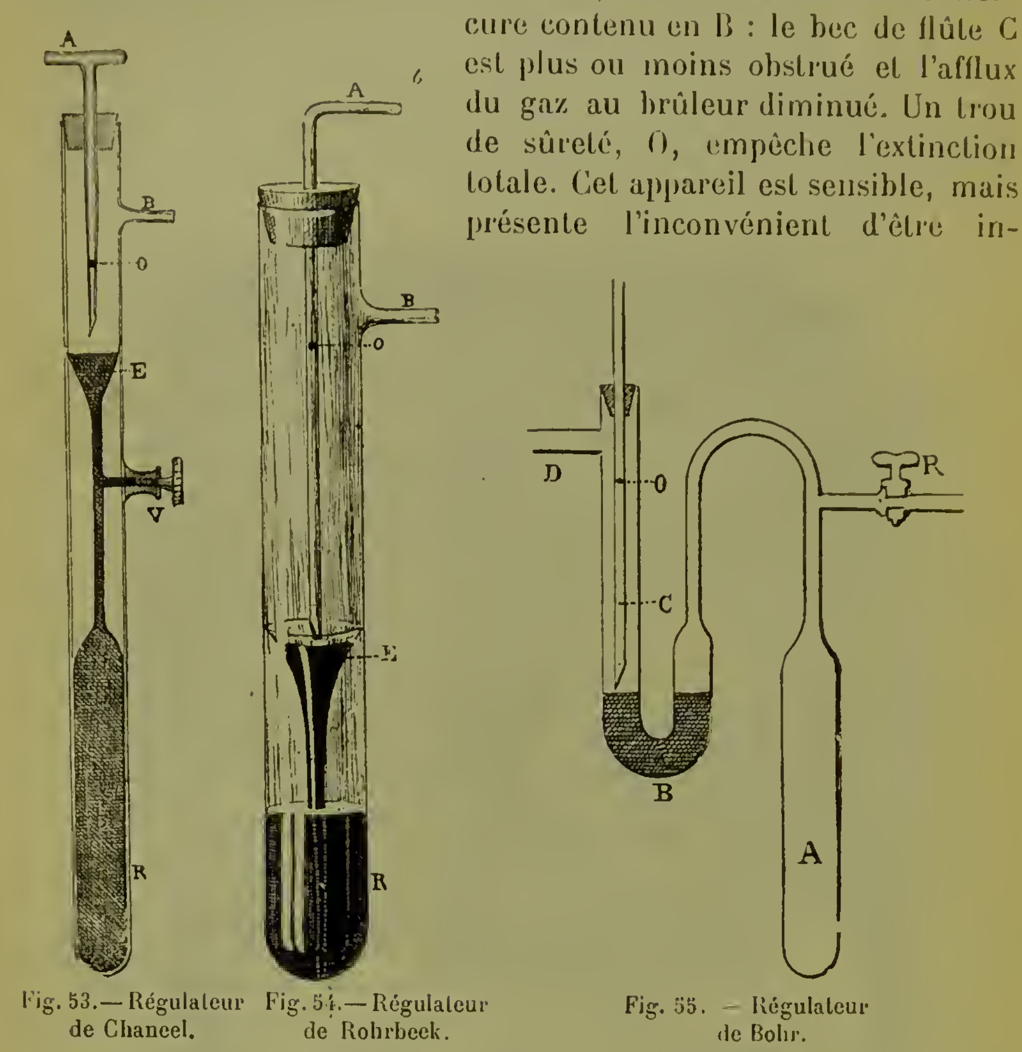


Fig. 53.— Régulateur de Chancel. Fig. 54.— Régulateur de Rohrbeck. Fig. 55. — Régulateur de Bohr.

ÉTUVE DE D'ARSONVAL.

Le principe du régulateur de d'Arsonval est basé sur les déformations que subit une lame élastique soumise à des pressions différentes.

L'étuve possède une paroi métallique, 2 (fig. 56 et 57). A sa partie inférieure la paroi extérieure est formée par une lame d'acier flexible, 3, qui constitue le plafond d'une chambre, 10, dans laquelle pénètre un ajutage, 12, par lequel arrive le gaz; deux tubes, 13 et 13′, assurent la sortie du gaz qui se rend aux brûleurs. L'extré-

mité de l'ajutage 10 peut être rapprochée ou éloignée de la lame 3 au moyen d'un pas de vis ; quand elle se trouve au contact de la lame, le gaz ne peut passer. Éloigne-t-on au contraire le tube de la lame, le gaz circule librement et se rend au brûleur.

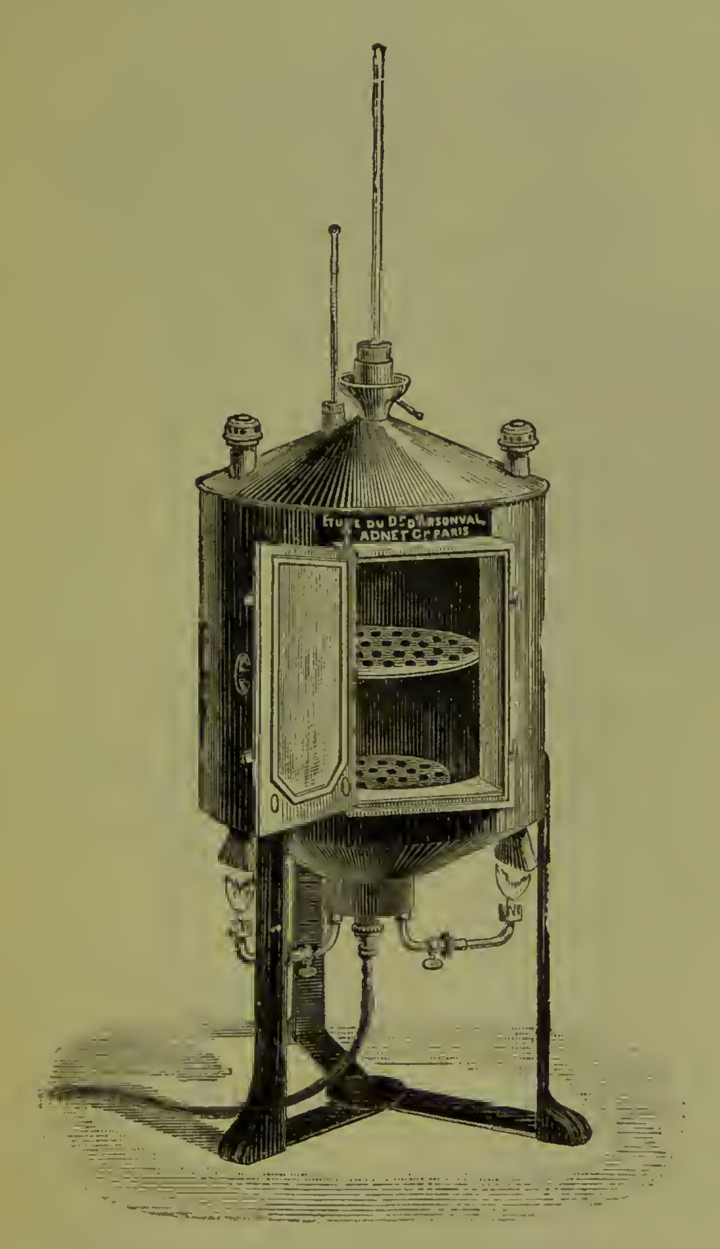


Fig. 56. — Nouvelle étuve autorégulatrice de d'Arsonval.

La double paroi est remplie d'eau par un orifice, 5 ; elle est, de toute autre part, hermétiquement close. Supposons que l'on veuille régler l'appareil à 37°, on éloigne le tube 10 de la lame 3 de façon à ce que le gaz brûle à pleine flamme ; quand le thermomètre atteint

36° à l'intérieur de l'étuve, on approche le tube 10 de la lame 3 de manière à diminuer légèrement la hauteur de la flamme du brûleur. Si on bouche alors hermétiquement l'orifice 5, toute nouvelle élévation de température détermine la dilatation de l'eau de la double paroi et par conséquent le refoulement de la plaque 10 et l'interruption du cours du gaz. En réalité on ne ferme pas complètement l'orifice 5, mais on y place un bouchon, muni d'un tube de verre : sous l'influence de la dilatation le liquide monte dans le tube, la pression augmente sur le fond de l'étuve et la lame 3 est refoulée.

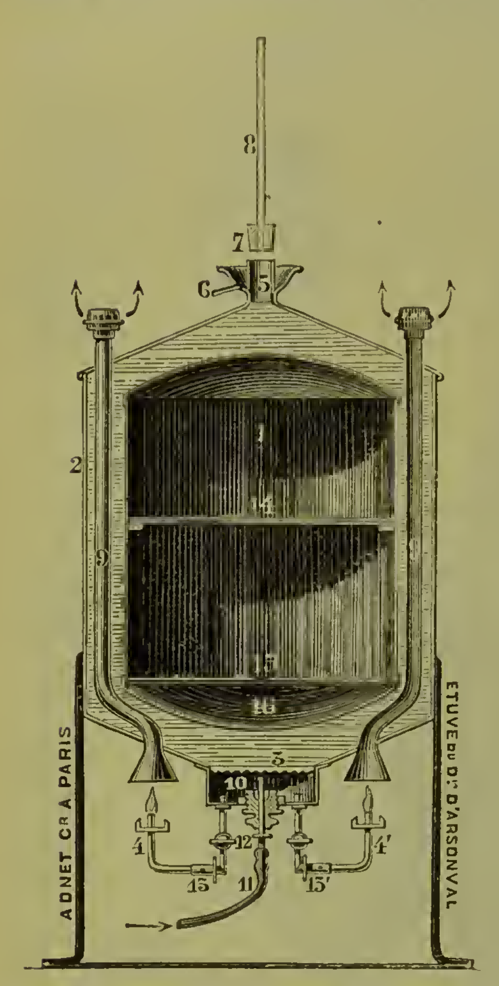


Fig. 57. — Coupe de l'étuve autorégulatrice de d'Arsonval.

Remarque. — Avoir soin de se servir pour le remplissage de l'étuve d'eau récemment bouillie ; si l'on employait de l'eau ordinaire, les bulles d'air se dégageant sous l'influence de la chaleur feraient varier le niveau du liquide et l'appareil serait déréglé.

Dans un autre modèle le régulateur est placé latéralement et la lame d'acier remplacée par une membrane de caoutchouc plus sensible.

L'étuve de d'Arsonval présente plusieurs inconvénients :

1° La forme de l'étuve ne permet d'utiliser qu'une petite portion de sa capacité ;

2° Le réglage étant fonction du niveau de l'eau dans le tube 8, la température de l'étuve s'élève à mesure que ce niveau baisse, ce qui se produit fréquemment par évaporation, suintement des joints, etc. ; d'où nécessité d'une surveillance assidue ;

3° L'élasticité des lames élastiques diminue à la longue et l'étuve se dérègle.

ÉTUVE DE ROUX.

L'étuve de Roux (fig. 58) répond à tous les besoins de la technique bactériologique sans présenter les inconvénients des appareils pré-

cédents, c'est celle dont l'usage est le plus recommandable.

Cette étuve se compose d'une armoire rectangulaire en bois, de dimensions variables, fermée à sa partie antérieure par une ou deux

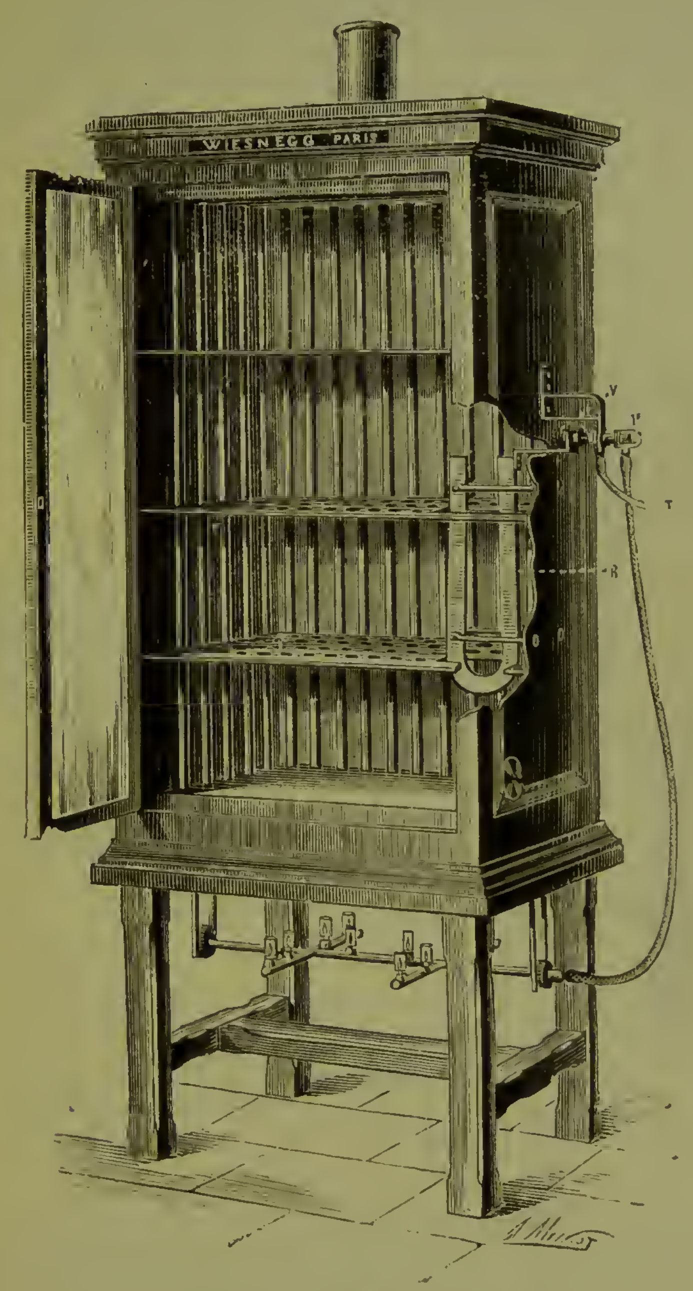


Fig. 58. — Étuve de Pasteur modifiée par Roux.

portes vitrées et disposée sur des pieds au-dessus d'un brûleur à gaz. Elle contient une série de tubes de cuivre placés verticalement contre la face interne des parois de bois. Les gaz de combustion du brûleur s'engagent dans les tubes et ceux-ci déterminent

par rayonnement un échauffement uniforme de l'air contenu dans l'appareil ; la ventilation est assurée par des orifices ménagés à la partie inférieure et dans le plafond de l'étuve.

Le régulateur est entièrement métallique (fig. 58 et 59), il est constitué par une lame de zinc et une lame d'acier soudées ensemble et recourbées en forme d'U. Le métal le plus dilatable, le zinc, étant en dehors, toute élévation de température tend à rapprocher les deux branches et tout abaissement les écarte l'une de l'autre.

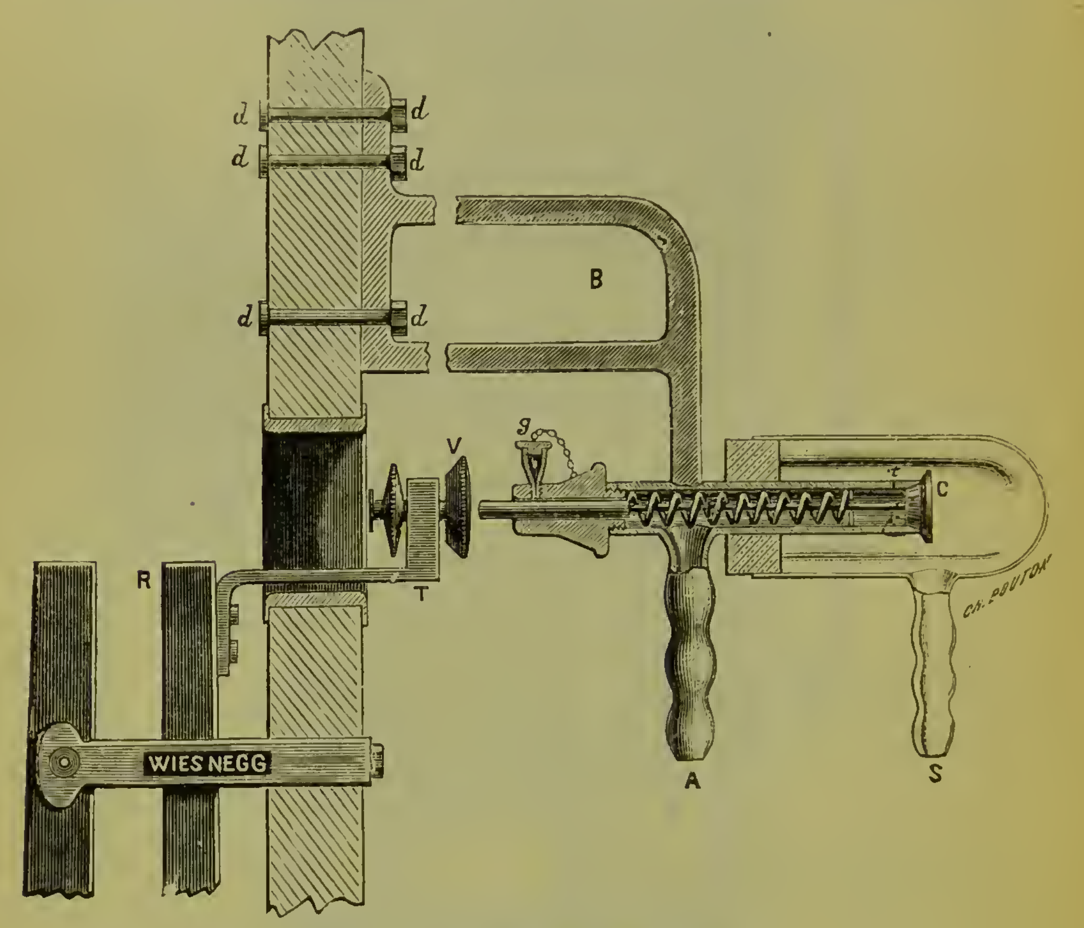


Fig. 59. — Régulateur métallique de Roux.

La branche gauche de l'U étant fixée, la branche R restée libre totalise les déformations provoquées par l'élévation ou l'abaissement de la température de l'étuve et par l'intermédiaire d'une tige rigide horizontale les transmet au piston C qui commande l'arrivée du gaz et qui est placé extérieurement.

Le gaz, en effet, arrive par le tube A relié au robinet de la conduite, et, pour pénétrer dans l'ampoule d'où part le tube S qui le conduit au brûleur, il doit passer au-dessous du piston C.

Lorsque la température s'élève dans l'étuve, la branche R se rapproche de l'autre, entraînant avec elle la tige rigide; le piston, sollicité par un ressort à boudin, se ferme (position indiquée dans la figure), ne laissant pour tout passage au gaz qu'un trou de sûreté ou rallumeur t, de suite la température s'abaisse. Quand la température de l'étuve est trop basse, le phénomène inverse se produit, la tige rigide est refoulée par la branche R, elle repousse le piston C qui donne alors passage au gaz et la flamme du brûleur augmente d'intensité; après quelques oscillations au-dessus et au-dessous de la température de régime, l'étuve est définitivement réglée. On peut facilement faire varier en plus ou en moins la température, il suffit pour cela d'augmenter ou de diminuer la longueur de la tige rigide T, ce qu'on obtient en tournant ou détournant la vis V.

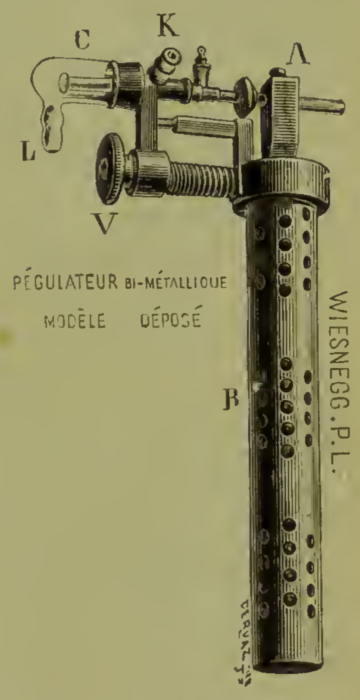


Fig. 60. — Régulateur de Roux à tube.

Dans un autre modèle, qui permet d'obtenir une plus grande précision dans le réglage, la longueur de la tige rigide est invariable, mais on en approche ou on en éloigne plus ou moins le piston au moyen d'une vis de rappel actionnée par un ressort à boudin (V. fig. 60).

Dans certains cas les tiges de fer et de zinc sont rectilignes et l'appareil a la forme d'un tube métallique B; on emploie ce modèle lorsque le régulateur doit être immergé dans l'eau (étuve à manchon d'eau, bain-marie, etc.) (fig. 60).

On peut enfin adapter un régulateur de Roux à un poêle à gaz et chauffer ainsi une pièce entière qui servira de grande étuve, soit dans les laboratoires où travaillent de nombreux élèves, soit pour la fabrication des toxines.

Mise en fonctionnement. — 1° Avant d'utiliser l'étuve, il est bon de garnir la face intérieure des portes vitrées avec du papier noir pour protéger les cultures contre l'action nocive de la lumière.

2° Placer un thermomètre à chaque étage de l'étuve pour y étudier la marche de la température. L'étuve réglée, chaque étage a une température absolument fixe, mais il existe des différences minimes de température entre les différents étages.

3° L'ajutage A (fig. 59) étant relié au robinet de la conduite et le tube S au brûleur, amener la vis V au contact de la tige qui com-

mande la soupape C et la faire tourner jusqu'à ce que cette soupape soit largement ouverte.

4° Allumer le brûleur.

5° Quand le thermomètre de l'étage moyen marque à un demi-degré près la température que l'on désire obtenir (36°,5 pour régler à 37° par exemple), on détourne la vis V jusqu'à ce qu'elle affleure simplement, sans la repousser, la tige de la soupape : la soupage se trouve alors fermée, le brûleur n'est plus alimenté que par le trou de sûreté. Mais, dès que la température baisse dans l'étuve, la branche R s'écarte de sa congénère, la vis V refoule le piston, la soupape s'ouvre et le gaz arrive en plus grande quantité au brûleur. L'appareil se trouve réglé.

Dès lors la température se maintient constante, sans qu'on n'ait plus à s'occuper du régulateur. On peut éteindre le brûleur en fermant le robinet de la conduite du gaz, puis le rallumer, la température se rétablit d'elle-même au degré fixé. Avoir soin, à de longs intervalles, de déposer un peu de vaseline dans le graisseur *g* pour lubrifier la tige du piston.

Article II. — ÉTUVES POUR COMBUSTIBLES AUTRES QUE LE GAZ.

Quand on ne dispose pas de gaz d'éclairage, il est très difficile d'obtenir une bonne régulation des étuves.

L'*étuve de Lion*, au pétrole, est quelquefois employée.

Deux modèles de Wiesnegg permettent d'utiliser un combustible quelconque. Dans le premier, l'étuve est chauffée directement par le foyer ; un régulateur de Roux actionnant une conduite d'eau permet l'arrivée de l'eau froide dans la double paroi de l'étuve dès que la température s'élève au-dessus du degré de régime. Dans un second appareil, la source de chaleur est placée sous une chaudière voisine de l'étuve et reliée à celle-ci par un tuyautage commandé par un régulateur de Roux : dès que la température de l'étuve s'abaisse, le fonctionnement du régulateur permet l'introduction d'eau chaude dans la double paroi. Ces appareils sont d'utilisation peu fréquente.

CHAPITRE V

ISOLEMENT DES GERMES

L'obtention d'une culture pure est la première condition des recherches bactériologiques : pour étudier la morphologie et la biologie d'un microbe, il faut commencer par l'isoler des autres germes, des *impuretés*, auxquels il peut se trouver mélangé.

Étant données les petites dimensions des microbes, on ne peut songer à prélever isolément un de ces êtres pour le reporter dans un milieu de culture, il faut donc recourir à des procédés plus compliqués. Les méthodes d'isolement employées en bactériologie sont nombreuses; pour la commodité de l'étude, on peut les ramener à deux groupes. Les premières sont d'ordre purement mécanique, elles comportent la *dilution* et la *dissémination* ; les secondes utilisent les *propriétés biologiques* du microbe qu'on se propose d'isoler.

Les procédés du premier groupe conviendront pour isoler chacune des espèces bactériennes que contient un produit donné; les procédés biologiques, au contraire, s'appliquent spécialement à la recherche de tel ou tel microbe que l'on présume exister dans le produit mis en expérience et dont on connaît à l'avance les propriétés capitales.

Avant tout, quand on se propose de pratiquer un isolement, il faut distinguer les microbes *aérobies* des *anaérobies stricts*; suivant que l'on se propose d'obtenir les bactéries du premier ou du second groupe, on fera les cultures en présence ou à l'abri de l'air. Dans les cultures à l'abri de l'air on isolera les différents microbes anaérobies par les procédés que nous étudierons plus loin. Pour le moment nous nous occuperons uniquement de la séparation des microbes aérobies.

ARTICLE I. — PROCÉDÉS MÉCANIQUES.

§ 1er. — DILUTION DANS LES LIQUIDES.

Ce procédé, imaginé par Lister, appliqué par Nœgeli et par Miquel, est peu employé aujourd'hui.

Soit à isoler les microbes contenus dans une goutte d'eau. Portons cette goutte d'eau dans un tube contenant 10 centimètres cubes de bouillon stérile (tube A) et mélangeons par agitation. Les germes que renfermait la goutte d'eau se trouvent dilués dans les 10 centimètres de bouillon; un centimètre cube correspondant à 20 gouttes, chaque goutte de bouillon contiendra 20 × 10, c'est-à-dire 200 fois moins de germes que la goutte d'eau mise en analyse. Reportons maintenant une goutte du mélange (tube A) dans un nouveau tube de bouillon stérile et répétons cette opération avec un certain nombre de tubes (B, B', B", etc.). Si notre goutte d'eau contenait 200 germes, chaque goutte du tube A contenait $\frac{200}{200}$ = 1 germe; ce microbe unique se développera dans chacun des tubes B, B', B", etc., et donnera une culture pure. La goutte d'eau ne contient-elle que 50 germes, un tube sur quatre donnera une culture; la goutte d'eau renferme-t-elle un plus grand nombre de germes, il sera nécessaire de la diluer davantage de façon à arriver à un mélange dont une goutte contienne au plus un germe, on portera par exemple 10 gouttes du tube A dans un tube de bouillon B avec une goutte duquel on pratiquera une série d'ensemencements C, C', C", etc.

Ce procédé d'isolement est très rigoureux, mais il a l'inconvénient d'être long et pénible, aussi lui préfère-t-on d'ordinaire la méthode suivante.

§ 2. — DISSÉMINATION.

L'isolement des germes par dissémination, imaginé par Koch, exige l'emploi de milieux de culture solides. Ce procédé peut être utilisé suivant deux modes différents : tantôt on ensemence le milieu préalablement liquéfié, tantôt on répartit directement les germes à la surface du milieu solide.

I. — DISSÉMINATION EN MILIEUX SOLIDES LIQUÉFIÉS.

Soit à isoler les germes contenus dans une goutte d'eau. Nous portons cette goutte d'eau dans un tube de gélatine liquéfiée au

bain-marie et nous mélangeons intimement. Les germes de la goutte d'eau se répartissent dans la gélatine; coulons maintenant cette gélatine en couche mince sur une plaque de verre et refroidissons-la rapidement : les microbes se trouvent disséminés et enrobés



Fig. 61. — Aspect de colonies microbiennes sur plaque de gélatine (grandeur naturelle).

dans la couche de gélatine comme les amandes dans la pâte d'un nougat; si nous exposons la plaque à une température favorable, chaque microbe germera isolément et donnera naissance à une colonie constituée par des individus provenant du germe unique initial, et par conséquent pure. Il sera aisé dès lors de reprendre

chacune de ces colonies et de les réensemencer sur des milieux neufs.

La mise en pratique de ce procédé peut être réalisée de différentes façons, mais elle est toujours subordonnée aux règles suivantes :

1° *Avant d'ensemencer la gélatine liquéfiée, la laisser refroidir suffisamment (30° à 40°) pour que les germes ne soient pas détruits par la température du milieu;*

2° *Opérer à l'abri de toute contamination ;*

3° *Placer les plaques à l'abri des poussières atmosphériques.*

A. **Boîtes de Petri.** — Procédé recommandé. — *Instrumentation.* — Trois boîtes de Petri (fig. 62) enveloppées de papier filtre et flam-

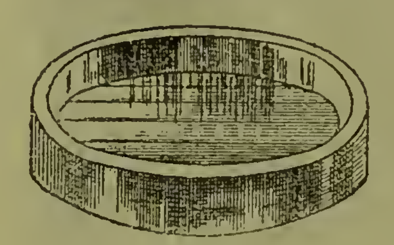
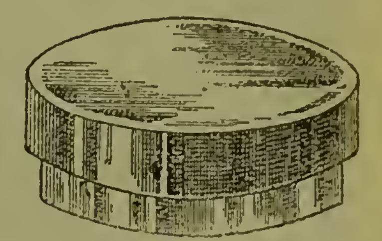



Fig. 62. — Boîtes de Petri.

bées au four Pasteur (préparer d'avance une provision de ces boîtes) ;

Trois pipettes de Pasteur ;

Trois tubes de gélatine.

Opération. — 1° Liquéfier au bain-marie la gélatine des trois tubes.

Ne jamais exposer directement les tubes à la flamme pour liquéfier la gélatine ; il se produirait dans le milieu des bulles d'air qui gêneraient les observations ultérieures.

2° Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur, en prenant les précautions d'usage, une goutte du liquide dont on veut isoler les germes.

Porter cette goutte dans un tube de gélatine (tube I) en observant les règles ordinaires; replacer le bouchon d'ouate du tube et assurer le mélange exact en roulant rapidement le tube entre les deux mains.

Ne jamais mélanger en agitant le tube de haut en bas comme on le fait en chimie, la gélatine produirait ainsi une mousse fort gênante.

3° Avec une nouvelle pipette Pasteur, prélever trois gouttes dans le tube I et les reporter dans le second tube de gélatine liquéfiée (II) ; mélanger comme plus haut.

4° Prélever de même trois gouttes du tube II et les ensemencer dans le troisième tube de gélatine (III).

On obtient ainsi trois dilutions différentes de la semence; suivant que celle-ci contenait beaucoup ou peu de germes, la dilution III ou la dilu-

tion I donneront les résultats les plus favorables. S'il y a beaucoup de germes, par exemple, leur abondance rendra les colonies confluentes et gênera l'isolement sur la plaque préparée avec la dilution I : on se reportera alors aux dilutions II et III.

5° Débarrasser une boîte de Petri de son enveloppe de papier.

Déboucher purement le tube I, en flamber l'orifice dans la flamme d'un bec de Bunsen. Soulever le couvercle de la boîte de Petri, couler la gélatine dans la boîte, replacer rapidement le couvercle. Communiquer quelques oscillations à la boîte pour étaler la gélatine en couche uniforme, puis déposer la boîte sur une surface horizontale et froide et laisser la solidification se produire. Cela fait, étiqueter et placer à l'étuve à 20°.

6° Opérer de même pour les tubes II et III.

7° Examiner chaque jour les boîtes, noter le développement des colonies, leurs caractères (examen à l'œil nu et à la loupe à travers la paroi de verre de la boîte); enfin prélever avec une öse un échantillon de chaque colonie pour les examens microscopiques et les réensemencements.

Remarque. — Cette méthode présente quelques inconvénients et ne peut être appliquée dans tous les cas :

a. Certains microbes liquéfient rapidement la gélatine, l'isolement se trouve ainsi compromis et interrompu.

b. Ce procédé ne convient qu'aux bactéries cultivant à des températures inférieures à + 20° ou 23°, la gélatine se liquéfiant à 25°.

Aussi a-t-on recours dans certains cas, et particulièrement dans la recherche des bactéries pathogènes, aux plaques préparées avec la *gélose*. On opère alors comme précédemment en tenant compte des observations suivantes :

1° La gélose solidifiée ne se liquéfie qu'entre 60° et 100°, mais elle reste alors liquide jusqu'à + 40°. Les tubes de gélose seront donc liquéfiés dans l'eau bouillante, puis on les laissera refroidir jusqu'à ce que leur température soit aisément supportée par la main.

2° Ensemencer alors les tubes comme il a été dit plus haut, mais opérer très rapidement la confection des boîtes, sans quoi la gélose se solidifierait et formerait des grumeaux dans les tubes.

Il est bon, pour éviter la production de grumeaux lors du refroidissement dans les boîtes, de placer celles-ci, avant que d'y verser la gélose, sur une platine contenant de l'eau à 40°-45° (Voy. plus bas) et de ne les laisser refroidir que progressivement.

3° Placer les boîtes à l'étuve à 37°; pour empêcher la dessiccation de la gélose, disposer les boîtes dans une chambre humide consti-

tuée par un cristallisoir à cloche dans le fond duquel on dispose une feuille de papier filtre imbibée d'eau.

On pourrait opérer de même avec l'*agar-gélatine* pour les cultures devant être maintenues entre 20° et 30°.

B. **Plaques de Koch.** — *Instrumentation.* — Trois lames de verre mesurant environ $9^{cm} \times 12^{cm}$, enveloppées séparément dans du papier et stérilisées au four Pasteur (tenir préparée une provision de ces plaques).

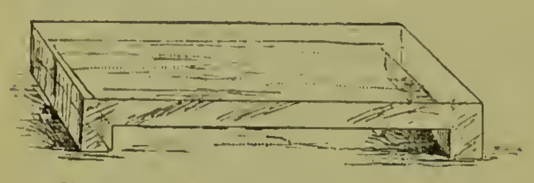


Fig. 63. — Banc de verre pour culture sur plaques.

Trois bancs en verre destinés à supporter les lames.

Un cristallisoir à cloche constitué par deux cristallisoirs d'environ 20 centimètres de diamètre, s'emboîtant l'un dans l'autre.

Une table refroidissante constituée par une boîte métallique plate dont la face supérieure est soigneusement dressée et recouverte par une cloche C (fig. 64); la boîte est supportée par des vis calantes; par

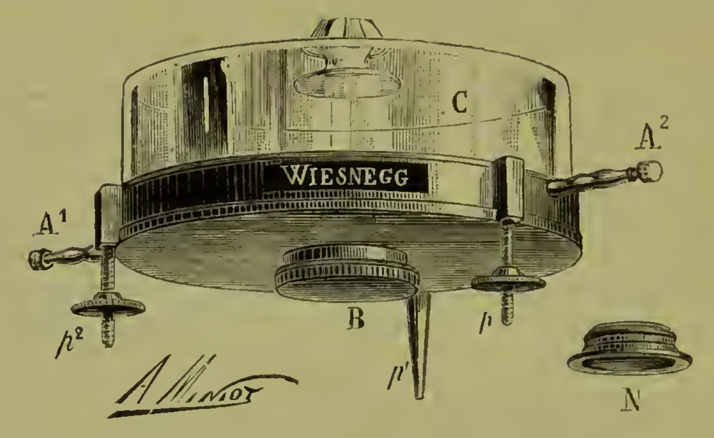


Fig. 64. — Platine refroidissante pour plaques de gélatine.

les deux ajutages A^1 et A^2 on peut y faire circuler un courant d'eau froide (ou chaude quand on opère avec la gélose) et une ouverture à vis B permet d'y introduire des morceaux de glace. Un niveau d'eau N sert à donner à l'appareil une position horizontale.

Trois tubes de gélatine liquéfiée au bain-marie et trois pipettes Pasteur.

Opération. — 1° Verser dans le cristallisoir à cloche une petite quantité de la solution de sublimé acide et en renversant et agitant l'appareil assurer le contact du sublimé avec tous les points de ses parois intérieures.

Disposer dans le fond du cristallisoir une rondelle préparée avec deux ou trois doubles de papier filtre et imbibée de la solution de

sublimé. (Cette disposition, dite *chambre humide*, a pour but d'empêcher la dessiccation des plaques de gélatine.)

Laver également les bancs de verre avec le sublimé, placer un de ces bancs sur le fond du cristallisoir.

2° Disposer horizontalement sur la table (à la gauche de l'opérateur) la platine refroidissante pleine d'eau froide ou glacée. Le plateau supérieur de l'appareil est essuyé avec soin pour le débarrasser de toute poussière, l'intérieur de la cloche est lavé au sublimé.

3° Ensemencer les trois tubes de gélatine I, II, III comme il a été dit pour le procédé précédent.

4° Prendre une des plaques de verre, déchirer le papier qui l'entoure suivant un de ses bords, saisir un coin de la plaque entre le pouce et l'index de la main droite, la dégager vivement du papier et la porter sur la platine refroidissante dont la cloche est légèrement

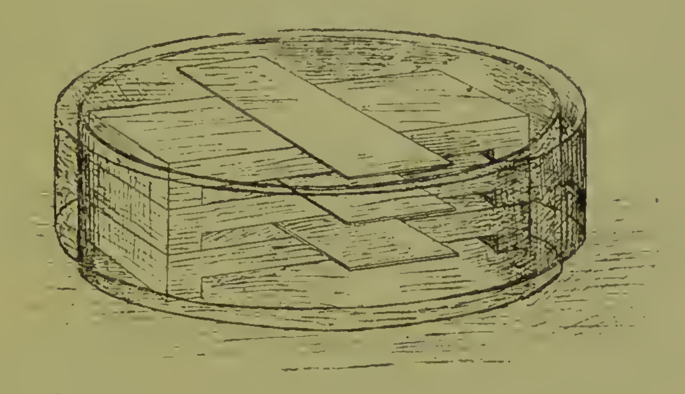


Fig. 65. — Disposition des plaques dans le cristallisoir.

soulevée par la main gauche de l'opérateur; laisser retomber la cloche au-dessus de la plaque.

5° Déboucher aseptiquement le tube III, passer dans la flamme sa partie supérieure sur une hauteur de 2 à 3 centimètres, l'engager sous la cloche de verre légèrement soulevée; verser la gélatine au centre de la plaque, l'y étendre largement à l'aide de la partie flambée du tube. Retirer le tube, reposer la cloche, attendre la solidification de la gélatine.

6° La solidification achevée, soulever de nouveau la cloche, saisir avec la main droite un des coins de la plaque, retirer celle-ci de dessous la cloche, la porter vivement dans la chambre humide (dont le couvercle est soulevé par la main gauche de l'opérateur qui vient d'abandonner la cloche de la platine) et la déposer sur le banc de verre.

Placer immédiatement le second banc de verre, en pont, au-dessus de la plaque, laisser retomber le couvercle de la chambre.

La gélatine de la plaque n'a jamais aucun contact ni avec la paroi de la chambre humide ni avec les bancs de verre : c'est pourquoi le sublimé peut être employé pour la stérilisation de ces appareils.

7° Préparer de même une plaque avec le tube II, la placer dans la chambre humide, disposer au-dessus le troisième banc.

8° Terminer en préparant une plaque avec le tube I; la placer sur le troisième banc.

9° La chambre humide est maintenue à +20°. Les plaques ont été disposées dans cette chambre de façon que la plaque la plus chargée en germes se trouve à la partie supérieure : c'est sur elle que les premières colonies apparaîtront; on pourra l'examiner et l'étudier sans toucher aux autres plaques que l'on ne découvrira qu'à mesure de leur développement.

Inconvénients. — 1° Ce procédé, assez élégant, a l'inconvénient d'exiger des manipulations compliquées, difficiles à exécuter rigoureusement.

2° Les plaques pendant les manipulations sont nécessairement exposées pendant quelques secondes à l'air et peuvent se contaminer; cette exposition a peu d'inconvénients si on opère très rapidement dans une atmosphère calme ne contenant pas de poussières en mouvement.

3° Pour examiner les plaques on est forcé de les découvrir et de les exposer à l'air, elles se contaminent rapidement et l'observation perd sa rigueur.

C. **Tube d'Esmarch**. — *Instrumentation.* — Trois pipettes Pasteur;

Trois tubes de gélatine; ces tubes doivent être un peu plus longs et un peu plus larges que les tubes à culture ordinaires; chacun renferme 10 centimètres cubes de gélatine stérile;

Trois capuchons en caoutchouc stérilisés.

Opération. — 1° Ensemencer les trois tubes I, II, III, comme il a été dit plus haut.

2° Couvrir l'orifice de chaque tube, au-dessus du bouchon d'ouate, avec un capuchon de caoutchouc.

3° Porter successivement chaque tube au-dessous d'un robinet d'eau froide, incliner le tube de telle sorte que la gélatine se répartisse sur toute sa longueur (sans atteindre le bouchon d'ouate) et lui imprimer un mouvement rapide de rotation en maintenant les deux extrémités entre le pouce et l'index de chaque main. La gélatine se solidifie en formant un revêtement régulier sur toute la surface interne du tube, on obtient une plaque enroulée en cylindre.

4° La solidification terminée, retirer le capuchon de caoutchouc et porter les tubes à l'étuve à 20°.

Ce procédé a le grand avantage de soustraire complètement les cultures

à toute cause de pollution, mais l'étude des colonies est rendue peu aisée par la forme cylindrique de la plaque de gélatine.

II. — DISSÉMINATION A LA SURFACE DES MILIEUX SOLIDES.

Quand on désire isoler les microbes contenus dans un corps solide tel qu'une fausse membrane, un crachat visqueux, etc., on badigeonne avec une parcelle de ce corps la surface d'un milieu nutritif solide disposé soit en plaque, soit en tube incliné. Ce procédé, classique aujourd'hui pour l'isolement du bacille diphtéritique dans les fausses membranes, permet d'utiliser pour l'isolement des milieux nutritifs non liquéfiables par la chaleur : pomme de terre, sérum, par exemple.

En pratique on peut opérer de deux façons différentes :

A. **Ensemencement en strie.** — Nous prendrons comme type un isolement sur plaque de gélose.

Instrumentation. — Öse de platine avec fil moyen ou fort ;

Un tube de gélose ;

Une boîte de Petri stérilisée.

Opération. — 1° Liquéfier la gélose et la couler dans la boîte de Petri en observant les règles formulées plus haut.

Laisser la gélose se solidifier complètement.

2° Prendre alors avec l'öse une parcelle du produit à ensemencer. Soulever le couvercle de la boîte de Petri, porter l'öse sur la surface de la gélose et couvrir celle-ci d'une série de stries rectilignes éloignées de quelques millimètres l'une de l'autre, sans recharger l'öse.

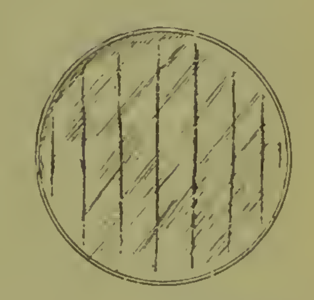


Fig. 66. — Isolement sur plaque par la méthode des stries.

A chaque strie, l'öse abandonne un peu de la semence qu'elle porte avec elle, on conçoit que bientôt les stries ne seront plus ensemencées qu'avec un très petit nombre de microbes.

3° La plaque étant portée à l'étuve à 37°, les colonies se développent très abondantes au niveau des premières stries, de plus en plus rares et bien isolées au niveau des dernières.

B. **Ensemencement en surface.** — Nous décrirons un isolement sur sérum incliné ; opérer de même sur gélose, sur pomme de terre, etc.

Instrumentation. — Öse forte aplatie en palette ;

Trois tubes de sérum solidifié incliné.

Opération. — 1° Prélever avec l'öse une petite quantité du produit à ensemencer.

2° Déboucher purement un tube de sérum, porter l'extrémité de l'öse sur la partie la plus reculée de la surface du sérum, puis la ramener vers l'orifice du tube en la promenant transversalement de manière à badigeonner la totalité de la surface du sérum (tube I).

3° Reporter immédiatement l'öse, sans la recharger, sur le second tube et opérer comme en 2 (tube II).

4° Répéter l'opération sans recharger l'öse, sur le troisième tube (III).

5° Porter les tubes à l'étuve à 37°.

Au cours de ces opérations l'öse s'essuie peu à peu et se dépouille progressivement des microbes dont elle était chargée : sur le tube I se développeront des colonies nombreuses et confluentes, mais les colonies seront de plus en plus rares et bien isolées sur le sérum des tubes II et III, c'est sur ces deux derniers tubes qu'on les observera.

Article II. — PROCÉDÉS BIOLOGIQUES.

Les méthodes d'isolement basées sur les propriétés biologiques des microbes ne peuvent être utilisées que lorsqu'on se propose de rechercher et d'isoler un germe donné ; on utilise alors certaines propriétés, connues à l'avance, de ce germe pour placer celui-ci dans des conditions propices à son développement et défavorables à la culture des autres microbes qui existent avec lui dans la semence.

La séparation des *aérobies* et des *anaérobies stricts* rentre dans cette catégorie de procédés d'isolement : ici on utilise la propriété qu'ont les aérobies de ne pouvoir se passer d'oxygène libre pour les éliminer dans les cultures faites à l'abri de l'air (chap. VI).

Nous décrirons les procédés les plus fréquemment utilisés.

§ 1er. — DESTRUCTION PAR LA CHALEUR DES GERMES COEXISTANTS.

Les bactéries non sporulées périssent rapidement quand elles sont exposées en milieu liquide à une température voisine de 60° ; au contraire les microbes pourvus de spores supportent pendant plusieurs minutes des températures de 80° à 100° et même 105°.

Il sera facile dès lors de séparer une bactérie sporulée d'un mélange où entrent des microbes asporulés : il suffira de soumettre pendant quelques minutes le mélange à une température comprise, suivant la résistance de la spore à isoler, entre 80° et 105°, puis de l'ensemencer dans un tube de bouillon. C'est ainsi qu'on peut purifier une culture sporulée impure de *B. anthracis* en l'exposant pen-

dant cinq minutes à une température de 80° à 85° ; l'infusion de foin, portée dix minutes à l'ébullition, donnera une culture pure du *Bacillus subtilis* ; une infusion préparée de même avec des fragments de pomme de terre, mise à l'étuve pendant deux ou trois jours puis exposée pendant cinq minutes à une température de 105°, donnera une culture pure de *B. de la pomme de terre*, etc.

Pour utiliser ce procédé, il faut avoir soin de toujours opérer avec un *mélange liquide*, les microbes desséchés ou protégés par des particules solides résistant beaucoup mieux à l'action de la chaleur ; de plus il faut veiller à ce que toutes les parties de la culture soient soumises à la température choisie, sans quoi quelques bactéries pourraient échapper à l'action destructive de la chaleur et l'opération ne donnerait aucun résultat.

On opérera de la façon suivante :

1° Préparer une pipette Pasteur étranglée au-dessous de l'ouate (Voy. p. 70). Cette pipette doit être de petit diamètre.

2° Aspirer la culture de façon à remplir la pipette jusqu'à l'étranglement, sceller dans une petite flamme l'effilure et l'étranglement.

3° Immerger complètement le tube clos ainsi préparé dans un bain-marie porté à la température choisie, maintenir cette température cinq à dix minutes suivant le cas, puis retirer le tube (pour les températures supérieures à 100° se servir de l'autoclave).

4° Essuyer le tube, flamber et briser entre les mors d'une pince une de ses extrémités, aspirer purement un peu de son contenu dans une pipette stérile et pratiquer les ensemencements définitifs.

§ 2. — CULTURES A LA TEMPÉRATURE OPTIMA ET CULTURES FRACTIONNÉES.

Certains germes se développent à toutes les températures comprises entre + 10° et +40°, mais la plupart des microbes présentent des températures limites de culture beaucoup moins élastiques ; c'est ainsi qu'un grand nombre de saprophytes poussent mal et lentement au-dessus de 30° ; au contraire, beaucoup de bactéries pathogènes présentent leur maximum de développement entre 30° et 40°, certaines ne pouvant cultiver au-dessous de 36°; d'autres encore se développent à 43°, température qui arrête la multiplication de la plupart des microbes. On applique ces propriétés à l'isolement des germes. On peut, par exemple, isoler le *Bacterium coli* des matières fécales en ensemençant celles-ci dans un tube de bouillon maintenu à 43° ; le *Bacterium coli* et le *Bacille typhique* seuls se développent

dans ces conditions (Rodet). Mais ce procédé ne donne pas du premier coup une culture pure : les germes qui coexistaient avec le *Bacterium coli* dans la semence n'ont pas été détruits ; ils ne se sont pas développés tant que la culture est restée à 43°, mais ensemence-t-on un peu de cette culture dans un tube de bouillon maintenu à 37°, ils trouveront des conditions favorables à leur développement et envahiront le bouillon. Pour les éliminer complètement, il faut recourir aux *cultures fractionnées* ; dès que le bouillon du premier tube exposé à 43° est trouble, on en prélève avec une öse une trace au moyen de laquelle on ensemence un nouveau tube (II) que l'on expose aussi à la température de 43° ; ce tube II servira à ensemencer de même un nouveau tube (III) ; après plusieurs passages ainsi répétés, on obtient une culture pure.

On opère d'une façon analogue pour isoler le *Bacille virgule* des selles cholériques, mais on combine à l'action de la température (37°-38°) celle d'un milieu spécial (Voy. plus bas) et la pratique des cultures fractionnées ; ce procédé peut être employé pour éliminer dans la plupart des cas les bactéries saprophytes.

§ 3. — CULTURES EN MILIEUX SPÉCIAUX.

On assure le développement d'un microbe aux dépens de celui des germes qui l'accompagnent en pratiquant l'ensemencement dans un milieu convenant spécialement à ce microbe.

C'est ainsi que l'on isole le *Bacille diphtéritique* en pratiquant la dissémination de la membrane sur des tubes de sérum ; l'isolement est favorisé par ce fait que le sérum est très apte au développement du *Bacille de Löffler* et convient mal aux microbes qui accompagnent d'ordinaire ce bacille.

Pour la recherche du *Vibrion du choléra*, Koch et Metchnikoff ont recommandé des milieux spéciaux, peu nutritifs, mais convenant bien au vibrion. On ensemence, par exemple, un peu de matière riziforme dans un tube de milieu gélo-pepto-sel (Voy. p. 32), que l'on maintient à 38° : le vibrion ne tarde pas à se développer tandis que la culture des autres bactéries est beaucoup plus lente à se produire.

Le vibrion, très aérobie, forme un *voile* à la surface du liquide ; prélève-t-on un peu de ce voile vers la douzième heure après l'ensemencement, on se trouve en présence d'une culture de vibrion *presque pure*. Pour arriver à la purification complète, il faut recourir aux cultures fractionnées (trois passages suffisent d'ordinaire) et l'on peut terminer en pratiquant un isolement sur plaque de gélatine, comme il a été dit page 84.

Dans d'autres cas, enfin, on arrête le développement des microbes à éliminer en ajoutant au milieu de culture un antiseptique dépourvu d'action sur le germe qu'on veut isoler. C'est ainsi que Chantemesse a recommandé les milieux phéniqués pour isoler le *Bacterium coli* et le *Bacille d'Eberth*, qu'Elsner a proposé dans le même but la gélatine à l'iodure de potassium, etc.

On peut combiner cette méthode avec celle de la culture à la température optima : c'est ce qu'a fait Vincent pour la recherche du *Bacille typhique* (Voy. chap. XXI).

§ 4. — INOCULATIONS A L'ANIMAL.

Étant donné un mélange contenant un microbe pathogène qu'on se propose d'isoler, on peut obtenir ce microbe à l'état de pureté en inoculant le mélange à un animal approprié.

Pour isoler le *Pneumocoque* dans des crachats pneumoniques, par exemple, on inocule un peu de ces crachats sous la peau d'une souris; l'animal ne tarde pas à succomber et son sang contient le microbe en culture pure.

De même, pour isoler le *Vibrion septique* d'une terre où il est mélangé à un grand nombre d'autres microbes, on délaye un peu de cette terre dans quelques gouttes d'eau stérile et on injecte le tout sous la peau de l'abdomen d'un cobaye ; l'animal succombe à la septicémie de Pasteur et son péritoine contient un exsudat séreux dans lequel on trouve le vibrion en culture pure.

Nous aurons l'occasion d'étudier de nombreuses applications de cette méthode d'isolement des germes.

CHAPITRE VI

CULTURE DES MICROBES ANAÉROBIES

Certains microbes sont indifféremment aérobies ou anaérobies (*anaérobies facultatifs*), d'autres ne sont susceptibles de se développer que dans un milieu strictement privé d'oxygène libre (*anaérobies stricts*). La culture des anaérobies stricts présente quelques difficultés liées à la nécessité de priver d'air le milieu nutritif, elle exige l'emploi de récipients spéciaux que nous devons étudier; les milieux nutritifs que l'on utilise sont ceux qui conviennent aux aérobies.

Nous devons d'abord apprendre à priver d'air les milieux de culture et les vases qui les contiennent.

Article I. — PROCÉDÉS POUR PRIVER D'AIR LES MILIEUX DE CULTURE.

I. — ÉBULLITION.

L'ébullition chasse les gaz en dissolution dans les liquides; pour priver d'air un milieu de culture, il faut prolonger l'ébullition pendant vingt minutes à une demi-heure, puis refroidir rapidement en préservant le milieu du contact de l'air atmosphérique.

II. — DÉPLACEMENT DE L'AIR PAR UN GAZ INERTE.

On peut débarrasser un liquide de l'air qu'il tient en dissolution en y faisant barboter un courant d'un gaz inerte : l'hydrogène, l'anhydride carbonique, l'azote, le gaz d'éclairage ont été recommandés pour cet usage.

A. **Hydrogène.** — C'est le gaz dont l'emploi doit être préféré : il se prépare facilement et n'exerce aucune action nocive sur les microbes.

On obtient facilement de l'hydrogène avec un appareil à dégagement continu construit ainsi que l'indique la figure 67.

Le flacon A contient de l'acide sulfurique pur dilué à 1 p. 8 ; le fond du flacon B est garni d'une couche de fragments de tubes de verre sur laquelle on dispose des rognures de zinc. Il suffit d'élever le niveau du flacon A et d'ouvrir le robinet R pour obtenir un dégage-

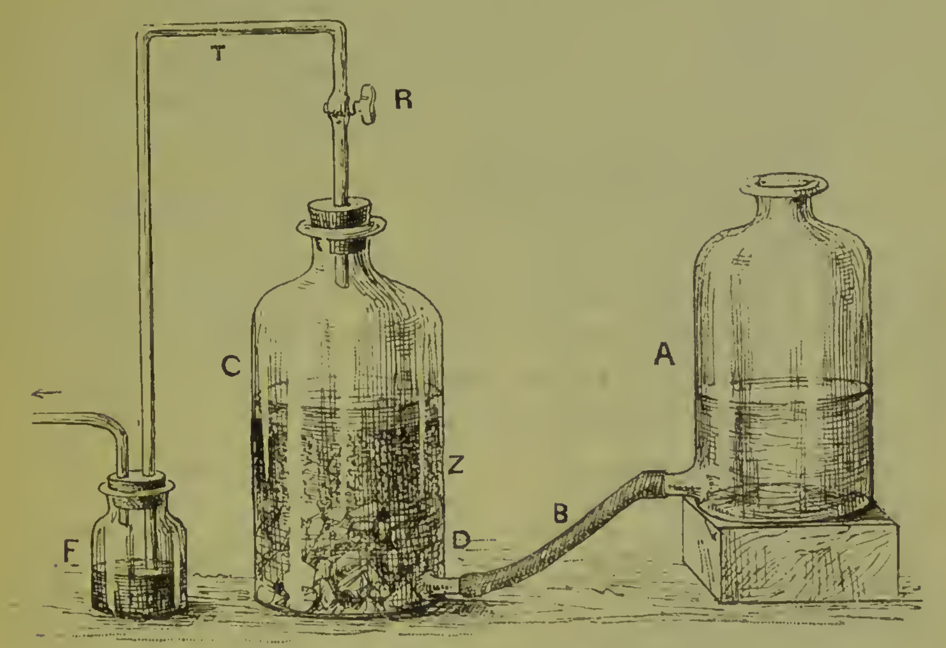


Fig. 67. — Appareil à dégagement continu d'hydrogène.

ment d'hydrogène par le tube T ; pour arrêter le dégagement, on ferme le robinet R et place les deux flacons sur le même plan. Le gaz, à la sortie de l'appareil, doit barboter dans un flacon laveur, F, contenant la solution suivante :

Solution de potasse à 50 p. 100..................	50 centimètres cubes.
Acide pyrogallique.............................	1 gramme.

Les impuretés, en particulier l'oxygène, sont ainsi arrêtées. Avant d'utiliser le courant d'hydrogène il faut s'assurer, au moyen de l'indigo blanc, qu'il n'entraîne aucune trace d'oxygène (Voy. p. 99).

B. **Anhydride carbonique**. — Ce gaz possède des propriétés nocives pour un grand nombre de microbes ; son emploi est peu recommandable. On le préparerait à l'aide de l'appareil que nous venons de décrire, en substituant au zinc des fragments de marbre blanc et à l'acide sulfurique de l'acide chlorhydrique. La solution de pyrogallate de potasse sera remplacée, dans le flacon laveur, par une solution d'hydrosulfite de soude (Voy. p. 100).

C. **Azote**. — Les difficultés de préparation de l'azote doivent faire abandonner l'usage de ce gaz en technique microbiologique.

D. **Gaz d'éclairage**. — On a constamment du gaz d'éclairage à

sa disposition dans un laboratoire, cependant son usage ne saurait être recommandé dans la technique anaérobique : beaucoup des composants qui entrent dans le mélange complexe qu'est ce gaz jouissent de propriétés nocives vis-à-vis des microbes.

Remarque. — Toutes les fois que l'on fait barboter un gaz inerte dans un milieu de culture, il faut avoir soin de filtrer ce gaz sur un tampon de coton stérilisé pour retenir les germes qu'il entraîne ; nous reviendrons plus tard sur les dispositifs à employer pour réaliser cette condition.

III. — ABSORPTION DE L'OXYGÈNE PAR L'ACIDE PYROGALLIQUE.

Pour priver un milieu d'oxygène on peut mettre à profit l'affinité que certains corps possèdent pour ce gaz. D'ordinaire on dispose le tube à culture dans un tube plus grand, long de 20 à 25 centimètres, sur un petit support en verre ou en métal (fig. 77). On place la solution suivante dans le fond du tube extérieur :

Acide pyrogallique	1 gramme.
Potasse à l'alcool	1 —
Eau	10 centimètres cubes.

On ferme le tube extérieur avec un bon bouchon de caoutchouc ; l'oxygène diffuse à travers le tampon d'ouate du tube à culture et est absorbé par la solution pyrogallique qui prend une teinte brune.

IV. — ABSORPTION DE L'OXYGÈNE PAR UNE CULTURE AÉROBIE.



En ensemençant à la surface d'une culture anaérobie en milieu solide un microbe avide d'oxygène, on soustrait cette culture au contact de l'air et le développement anaérobie peut avoir lieu sous la couche protectrice formée par le germe aérobie (Roux). Nous décrirons en détail ce procédé à propos des cultures en piqûre.

V. — EMPLOI DES MACHINES A VIDE.

L'emploi des machines à faire le vide simplifie et rend plus rigoureux les procédés de culture des anaérobies. Deux appareils à vide sont d'un usage journalier dans les laboratoires, ce sont la pompe à mercure et la trompe à eau. On joint d'ordinaire à l'emploi de ces instruments la pratique du *lavage* par un gaz inerte ; on arrive ainsi à chasser toute trace d'air des récipients de culture.

Le procédé du lavage par un gaz inerte est basé sur ce fait physique que les gaz entre lesquels il n'y a pas d'action chimique se mélangent rapidement dès qu'ils sont en contact et que leur mélange est uniforme et persistant; ce mélange étant d'ailleurs d'autant plus rapide que la différence des densités des gaz composants est plus grande.

En pratique, en effet, il est impossible d'obtenir dans un récipient le vide absolu (loi de décroissance de la force élastique; influence de l'espace nuisible, influence des rentrées d'air). Dans un vase préalablement rempli d'air et dans lequel on a ensuite pratiqué le vide, il reste donc toujours une faible quantité d'oxygène; on arrive à se débarrasser de ce gaz par le lavage; le résidu R, entièrement constitué par de l'air, lors de la première opération, sera composé alors que le récipient aura été rempli d'hydrogène, puis vidé de nouveau, par un mélange d'hydrogène et d'air; en répétant le lavage plusieur fois, la quantité d'air restant dans le résidu deviendra inappréciable.

Exemple : Dans un récipient de 2 litres, il reste, le vide étant fait, 1 centimètre cube d'air supposé ramené à la pression atmosphérique. Remplissons le récipient d'hydrogène, l'air se trouvera dilué à $\frac{1}{2000}$; le vide fait alors à 1 centimètre cube près laissera dans le récipient $\frac{1}{2000}$ centimètre d'air et $\frac{1999}{2000}$ centimètre d'hydrogène; après le second lavage la quantité d'air restante ne serait plus que de $\frac{1}{4000000}$ centimètre cube.

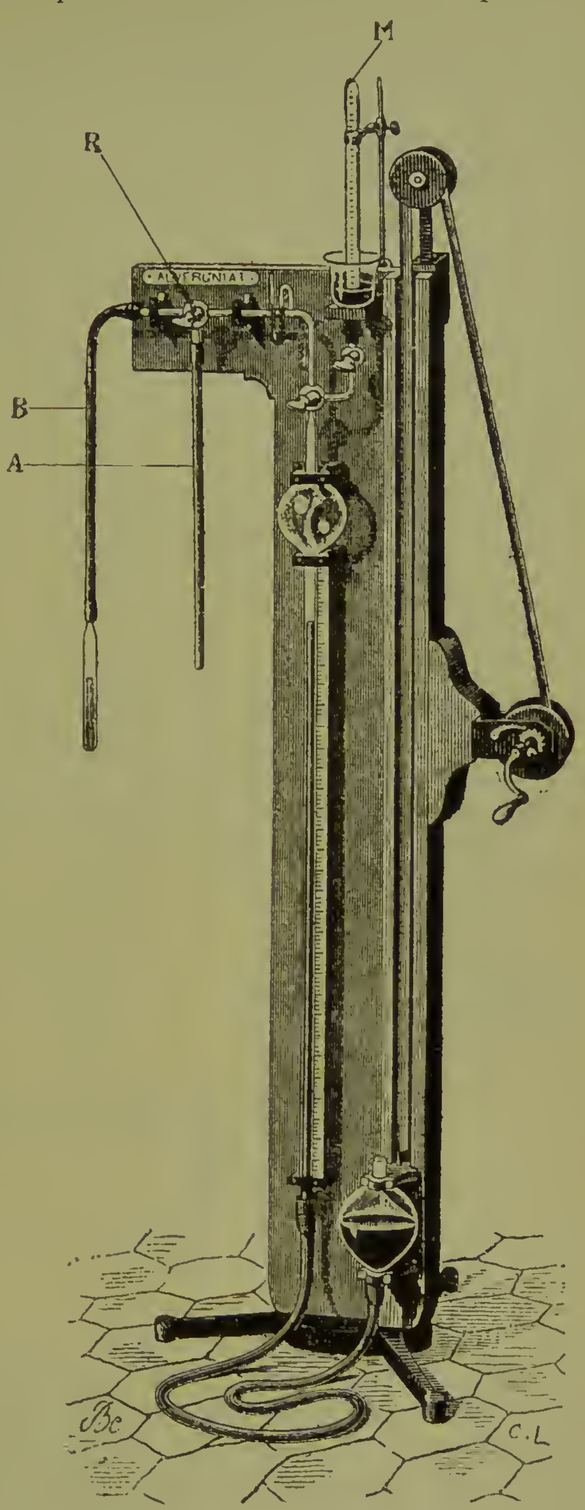


Fig. 68. — Pompe à mercure.

A. **Pompe à mercure.** — Cet appareil permet d'obtenir un vide presque parfait, mais il a l'inconvénient d'être coûteux, fragile, et d'un maniement délicat et lent. On ne l'emploie guère que dans les recherches très précises et pour des récipients de petites dimensions.

Sans insister sur la manœuvre de la pompe à mercure, nous rappellerons les points capitaux suivants :

1° Avoir soin de s'assurer avant chaque opération que l'appareil fonctionne bien, que les robinets ne perdent pas ; graisser légèrement ceux-ci au besoin.

2° Relier le récipient à culture à la branche B de la pompe ; faire le vide jusqu'à ce que la différence entre les niveaux du mercure dans les deux branches du manomètre soit inappréciable.

3° A ce moment, la branche A étant reliée à l'appareil à hydrogène, ouvrir doucement le robinet R qui la commande, laisser l'hydrogène pénétrer lentement dans le récipient jusqu'à ce que le mercure du manomètre soit revenu à sa position première.

4° Intercepter alors la communication entre la pompe et l'appareil à hydrogène (robinet R). — Faire de nouveau le vide. — Recommencer deux ou trois fois l'opération.

5° Sceller à la lampe, sous le vide, l'orifice de l'appareil à culture.

B. **Trompe à eau.** — En raison de la modicité de son prix et de la simplicité de son fonctionnement, cet appareil est le plus habituellement utilisé. Il ne donne qu'un vide approximatif et nécessite l'emploi du lavage. La trompe, métallique de préférence (modèle d'Alvergniat), doit être munie d'une rampe en cuivre portant un manomètre et se divisant en T ainsi que l'indique la figure 69.

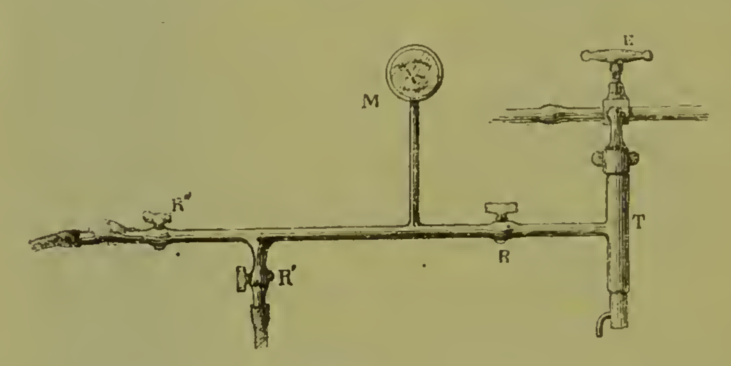


Fig. 69. — Disposition d'une trompe à eau.

Le fonctionnement de la trompe exige une pression d'eau d'environ deux atmosphères. Pour faire le vide :

1° Relier, au moyen d'un tube de caoutchouc à parois épaisses, dit *tube à vide*, le récipient à culture au robinet R'' et l'appareil à hydrogène au robinet R'. Les robinets R et R' sont fermés. Le robinet R'' reste ouvert pendant toute la durée de l'opération.

2° Ouvrir le robinet de la conduite d'eau E ; puis ouvrir progressivement R. Suivre la marche de l'aiguille du manomètre.

3° Quand le vide a été poussé aussi loin que possible, fermer R et ouvrir R′ progressivement : l'hydrogène pénètre dans le récipient.

4° Le manomètre étant retombé au zéro, fermer R′, ouvrir de nouveau R, le vide se produit une seconde fois dans l'appareil.

5° Après avoir pratiqué ainsi deux à trois lavages successifs on scelle au chalumeau, sous le vide, le col du récipient.

On peut parfois se dispenser des lavages par l'hydrogène ; dans ce cas on aide au déplacement de l'oxygène contenu dans le récipient en portant le liquide à l'ébullition, ce qu'on obtient facilement en élevant très légèrement la température (30° à 35°), soit en saisissant le vase de culture à pleine main, soit par immersion dans de l'eau tiède ou encore en léchant les parois du récipient avec une petite flamme.


Fig. 70. — Flacon de sûreté pour la trompe à eau.

Remarque. — Quand on se sert de la trompe à eau, toutes les fois que l'on interrompt une opération on doit fermer le robinet R qui supprime la communication entre la trompe et le récipient, avant de suspendre le cours de l'eau dans la trompe. Si l'on ne prenait pas cette précaution, le vide existant dans l'appareil provoquerait l'irruption brusque de l'eau dans le récipient.

Cette irruption de l'eau dans le récipient privé d'air se produirait encore si, pour une cause quelconque, la pression venait à baisser subitement dans la conduite d'eau pendant l'opération ; aussi, doit-on toujours interposer entre la trompe et le récipient à culture un flacon de 2 à 3 litres de capacité, disposé comme l'indique la figure 70. Si une projection se produit, l'eau est arrêtée dans ce flacon et ne souille pas la culture.

RÉACTIFS DE L'OXYGÈNE.

On a fréquemment besoin de s'assurer qu'un gaz (l'hydrogène employé pour les lavages, par exemple) ne contient pas d'oxygène. On utilise pour cela la propriété que présente l'indigo blanc de se colorer en bleu sous l'influence de petites quantités d'oxygène.

Pour préparer l'indigo blanc, on traite l'indigotine (indigo pur) par l'acide sulfurique concentré ; la solution neutralisée par du carbonate de

soude donne le *sulfo-indigonate de soude* qui, en présence d'un excès d'alcali, est facilement décoloré par les agents réducteurs. On réduit d'ordinaire ce produit par l'*hydrosulfite de soude* obtenu en versant sur de la poudre de zinc une solution concentrée de bisulfite de soude saturée d'anhydride sulfureux. L'hydrosulfite de soude est un réducteur énergique; il fixe l'oxygène de l'air en se transformant en bisulfite et décolore l'indigo bleu.

On s'assure qu'un gaz ne contient pas d'oxygène en le faisant barboter, à l'abri de l'air, dans la solution d'indigo blanc.

Quant on veut s'assurer qu'un milieu de culture ne renferme plus d'oxygène libre, on peut y ajouter quelques gouttes d'une solution 2 p. 1 000 de sulfo-indigotate de soude, jusqu'à obtention d'une coloration bleue très nette, puis 1 p. 100 en poids d'une solution normale de soude et 1 p. 100 de glucose. Dès que l'on a extrait tout l'oxygène du milieu, la coloration bleue disparaît, le glucose réduisant l'indigo dans ces conditions.

Si l'on ajoute simplement à un milieu de culture quelques gouttes de la solution de sulfo-indigotate de soude, puis qu'on le prive d'air et qu'on y ensemence un microbe anaérobie, la coloration bleue se détruira à mesure du développement de la culture, la décoloration commençant par les points en contact immédiat avec les colonies : le microbe emprunte l'oxygène combiné, qui lui est nécessaire, aux corps qui l'avoisinent et joue le rôle de réducteur.

Article II. — DISPOSITION DES CULTURES ANAÉROBIES.

§ 1er. — MILIEUX LIQUIDES.

A. **Procédé de Pasteur**. — Ce procédé, utilisé par Pasteur, dans ses recherches sur les fermentations, est abandonné aujourd'hui ; c'est le plus ancien des procédés de culture des anaérobies et à ce titre il mérite d'être décrit.

On remplit exactement avec le bouillon nutritif un grand ballon muni de deux tubulures (fig. 71) ; la tubulure recourbée B plonge dans une capsule de porcelaine aux trois quarts pleine du même liquide. Le robinet R étant fermé, on porte à l'ébullition pendant une demi-heure simultanément le ballon et la capsule. L'air dissous est ainsi chassé; on laisse refroidir l'appareil en place puis on transporte l'extrémité du tube recourbé dans un vase plein de mercure. On remplit l'entonnoir E d'anhydride carbonique, puis on y fait passer, à l'abri de l'air, le liquide à ensemencer. On ouvre alors le robinet R et on laisse écouler la semence dans le ballon en ayant soin qu'il reste un peu de liquide dans l'entonnoir, ce qui met à

l'abri de tout accès d'air dans le ballon. On porte alors à l'étuve.

B. **Procédé du tube à essai.** — 1° Prendre un tube à essai ordinaire et en étirer l'extrémité supérieure dans la flamme du chalumeau.

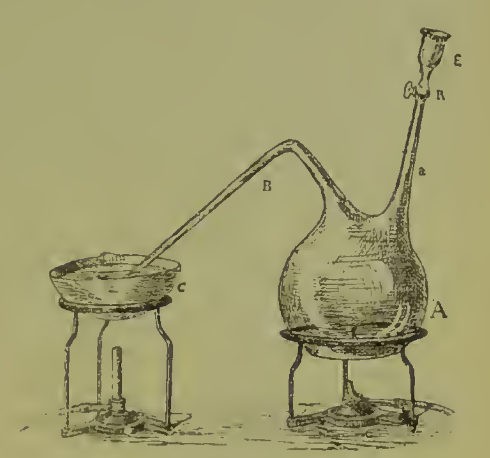


Fig. 71. — Appareil de Pasteur pour la culture des anaérobies.

2° Remplir le tube de bouillon ; le stériliser ouvert, et, à la sortie de l'autoclave, en sceller la pointe au chalumeau. Porter le tube ainsi fermé à 35° pendant quelques jours pour faire disparaître les traces d'air qui ont pu y rester.

3° Au moment de pratiquer l'ensemencement, flamber et briser l'extrême pointe, introduire dans le tube un fil de platine chargé de semence et refermer immédiatement au chalumeau.

C. **Pipette de Roux.** — Procédé recommandé. — 1° Prendre une pipette Pasteur stérilisée, l'étrangler sur la petite flamme du chalumeau, immédiatement au-dessous du tampon d'ouate (*a*, fig. 72).



Fig. 72. — Préparation de la pipette de Roux.

2° Flamber et casser la pointe de la pipette ; plonger l'extrémité ouverte dans un tube de bouillon ensemencé avec le microbe à cultiver ; aspirer le liquide dans la pipette de façon à emplir celle-ci aux trois quarts.

3° En inclinant la pipette de façon à élever la pointe, fermer celle-ci sur une petite flamme.

4° Relier l'extrémité supérieure de la pipette à la machine à vide. Pratiquer le vide et plusieurs lavages à l'hydrogène.

Il suffira souvent, le vide étant fait, de provoquer l'ébullition du liquide comme nous l'avons dit page 99. Dès que l'on chauffe la pipette, même très légèrement, le liquide bout violemment et tend à passer dans le tube d'aspiration : on évitera la production de ce phénomène en commençant par chauffer la partie supérieure de la pipette au-dessus du niveau du liquide.

5° Le vide étant fait, sceller la pipette à la flamme au niveau de l'étranglement *a*. Recouvrir les pointes du tube obtenu avec un peu de cire Golaz pour augmenter leur résistance. Porter à l'étuve.

6° La culture terminée, pour la retirer du tube, flamber et briser avec une pince l'une des extrémités de celui-ci, *a*, et aspirer le liquide dans une pipette Pasteur.

D. Tube de Pasteur, Joubert et Chamberland. — Cet appareil permet de faire deux cultures successives en pratiquant le réensemencement à l'abri du contact de l'air. Il est constitué (fig. 73) par un tube en U renversé dont chaque branche porte une tubulure effilée; de la convexité de l'U part une troisième tubulure où est disposé un tampon d'ouate entre deux étranglements.

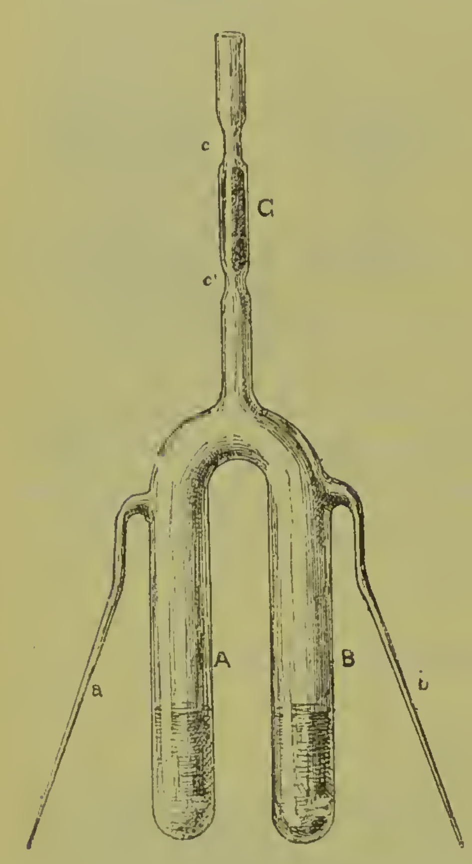


Fig. 73. — Tube de Pasteur, Joubert et Chamberland pour la culture des anaérobies.

1° Stériliser le tube au four Pasteur, les deux effilures *a* et *b* ayant été préalablement scellées dans la flamme.

2° Après refroidissement, flamber l'effilure *a*, en casser la pointe, la plonger dans le bouillon ensemencé, aspirer par C de manière à faire pénétrer le liquide dans la branche A. Fermer de nouveau l'effilure *a* au chalumeau.

3° Flamber l'effilure *b*, en casser la pointe, la plonger dans un tube de bouillon stérile, aspirer ce bouillon dans la branche B. Fermer la pointe de *b* au chalumeau.

Dans les temps 2 et 3, veiller à ce que les liquides des deux branches ne se mélangent pas; chaque branche ne doit être emplie qu'au tiers.

4° Relier la tubulure C à la machine à vide ; priver d'air l'appareil, pratiquer deux ou trois lavages à l'hydrogène; sceller dans le vide au niveau de l'étranglement *c*.

5° Porter le tube à l'étuve en le maintenant vertical ; la culture se produit dans la branche A, le bouillon de la branche B reste clair et sert de témoin.

6° Quand la culture est terminée en A, incliner l'appareil pour faire pénétrer dans la branche B quelques gouttes du contenu de A, placer de nouveau à l'étuve et le bouillon B se trouble à son tour.

E. **Tube de Pasteur**. — Ce tube est une simplification du précédent (fig. 74) ; il est constitué par une seule branche du tube en V que nous venons de décrire.

Après stérilisation du tube aspirer par l'effilure *a* le bouillon ensemencé ; fermer l'effilure, faire le vide par B, sceller en *b* et porter à l'étuve.

F. **Procédé du ballon à long col**. — Ce procédé est utilisé pour obtenir de grandes quantités de culture.

1° Un ballon à long col, rempli au tiers de bouillon, est bouché à l'ouate et stérilisé à l'autoclave (fig. 75).

2° Après refroidissement, enlever pure-

Fig. 74. — Tube de Pasteur pour la culture des anaérobies.

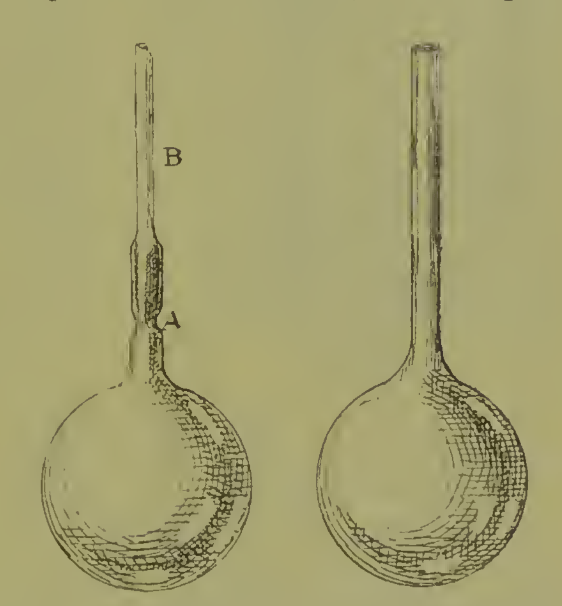


Fig. 75. — Disposition pour la culture des anaérobies dans les ballons à long col.

ment le tampon d'ouate et ensemencer le bouillon à l'aide d'une pipette à longue effilure. Le bouchon d'ouate est remis en place et repoussé jusqu'à la partie moyenne du col.

3° Étrangler légèrement le col au-dessous du tampon d'ouate, en A, puis étirer son extrémité supérieure B.

4° Relier le col effilé, B, à la trompe à eau ; faire le vide et laver à l'hydrogène ; sceller le col au chalumeau, sous le vide. Porter à l'étuve.

5° Pour retirer la culture du ballon, couper le col au niveau du bouchon d'ouate (Voy. p. 47) ; enlever ce bouchon et aspirer la culture dans une pipette ou un matras répartiteur stérilisés.

G. **Procédé du flacon.** — PROCÉDÉ RECOMMANDÉ. — Ce procédé permet, comme le précédent, d'opérer sur de grandes quantités de bouillon et rend très aisés les prélèvements de culture.

1° Choisir un flacon de 1 à 2 litres de capacité et dont le col admette un bouchon de caoutchouc à deux trous de moyen calibre. Le remplir aux deux tiers de bouillon (fig. 76).

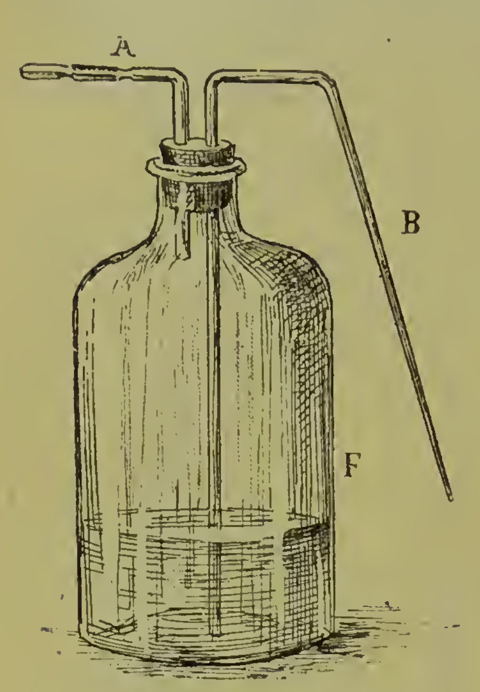


Fig. 76. — Dispositif pour la culture en flacon.

2° Dans un des trous du bouchon, engager un tube de verre, A, recourbé à angle droit, dont une branche plonge de quelques centimètres dans le flacon et dont l'autre, extérieure, est munie d'un tampon de coton entre deux étranglements.

L'autre trou reçoit un tube B dont une branche plonge jusqu'au fond du flacon et dont l'autre, extérieure, se termine par une effilure solide, fermée au chalumeau.

3° Le bouchon étant bien assujetti, stériliser l'appareil à 115° pendant vingt minutes. Chauffer lentement pour ne pas briser le flacon.

4° L'appareil refroidi, bien assurer le bouchon, recouvrir les joints du flacon et du bouchon et ceux du bouchon et des tubes avec de la cire Golaz ; dessécher le tampon d'ouate du tube A en chauffant légèrement le tube à son niveau avec une flamme de gaz.

5° Pour ensemencer : flamber, puis briser avec une pince la pointe de l'effilure B ; plonger l'orifice dans le tube contenant la semence, aspirer par A pour faire pénétrer quelques gouttes de semence dans le bouillon du flacon, puis refermer l'effilure B au chalumeau.

6° Relier A à la trompe à eau ; faire le vide tout en immergeant les deux tiers inférieurs du flacon dans de l'eau à 35°-40° ; pratiquer plusieurs lavages à l'hydrogène.

7° Sceller au chalumeau, sous le vide, l'étranglement de la branche A au delà du tampon d'ouate. Porter à l'étuve.

Au bout de deux à trois jours, les gaz produits par la végétation du microbe anaérobie s'accumulent dans le flacon et gênent la continuation de la culture ; il est bon de briser alors avec une forte pince l'extrémité scellée

du tube A : les gaz s'échappent et la culture reste protégée contre le contact de l'air par la production incessante de gaz liée au développement du microbe.

Certains microbes déterminent rapidement une acidité notable du milieu, acidité susceptible d'enrayer le développement de la culture; on y remédie en ajoutant au bouillon, avant la stérilisation, une petite quantité de carbonate de chaux ou de phosphate tricalcique : ces corps saturent les acides à mesure de leur production.

8° Pour retirer la culture du flacon, flamber l'effilure B et en briser la pointe : en soufflant par A on fait écouler le liquide dans un vase stérilisé.

II. **Procédé par l'acide pyrogallique (Buchner).** — 1° Porter à l'ébullition, puis refroidir rapidement un tube de bouillon stérile, bouché à l'ouate. Ensemencer.

2° Disposer ce tube, comme il a été dit page 96, dans un tube de plus grandes dimensions contenant une solution concentrée de pyrogallate de potasse; boucher avec soin et porter à l'étuve (fig. 77).



Fig. 77. — Dispositif de Buchner pour la culture des anaérobies.

Enfin, nous citerons pour mémoire les procédés aujourd'hui inutilisés de Cochin, Nencki, Rosenbach, Hüfner, Wurtz et Foureur, etc.

§ 2. — MILIEUX SOLIDES.

I. — *ENSEMENCEMENTS PAR PIQURE.*

A. **Procédé du tube à essai.** — PROCÉDÉ RECOMMANDÉ. — a. *Gélatine.* — 1° Prendre un tube de gélatine stérilisée et porter la gélatine à l'ébullition en procédant avec précaution pour éviter la production de mousse et les projections; maintenir l'ébullition pendant plusieurs minutes.

Avant l'ébullition, on peut ajouter à la gélatine quelques gouttes de la solution de sulfo-indigotate de soude : le microbe, en se développant, provoquera la décoloration du milieu.

2° Refroidir rapidement la gélatine; quand elle est devenue solide, l'ensemencer par piqûre avec le fil de platine fin.

L'öse entraînant toujours un peu d'air avec elle, on la remplace avantageusement par le dispositif suivant : on monte le fil de platine sur la paroi d'un tube de verre relié par un tuyau de caoutchouc au générateur d'hydrogène (fig. 78). Pour l'usage, flamber le fil de platine, prélever la semence,

puis ouvrir le robinet de l'appareil à hydrogène et pratiquer l'ensemencement dans un courant de ce gaz. On évite ainsi toute pénétration d'oxygène.

3° L'ensemencement pratiqué, le tube de gélatine est plongé dans de l'eau très froide et, avec une pipette de Pasteur, on verse à la surface de la gélatine un peu de gélose liquéfiée ; on forme ainsi au-dessus de la culture un bouchon qui empêche le contact de l'air. Replacer le tampon d'ouate du tube.

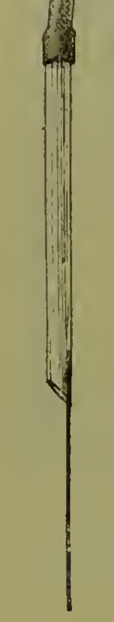
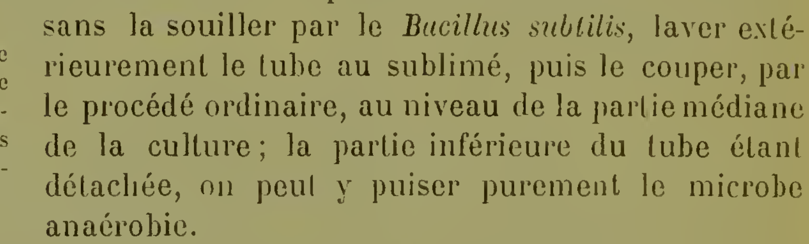


Fig. 78. — Öse montée sur tube creux pour l'ensemencement des cultures anaérobies.

On peut utiliser, au lieu de gélose, pour former le bouchon protecteur, de l'huile, de la vaseline liquide, etc., préalablement stérilisées.

b. *Gélose*. — Opérer comme pour la culture en gélatine.

B. **Absorption de l'oxygène par une culture aérobie** (**Roux**). — Opérer comme dans le procédé ci-dessus ; dès que le bouchon de gélose est solidifié, ensemencer sa surface avec une culture de *Bacillus subtilis* ; ce microbe, très aérobie, absorbe l'oxygène du tube et la culture anaérobie se développe au-dessous, à l'abri de ce gaz.



Pour faire une prise dans la culture anaérobie sans la souiller par le *Bacillus subtilis*, laver extérieurement le tube au sublimé, puis le couper, par le procédé ordinaire, au niveau de la partie médiane de la culture ; la partie inférieure du tube étant détachée, on peut y puiser purement le microbe anaérobie.

C. **Pipette de Roux**. — 1° Préparer une pipette de Roux (p. 101).

2° Flamber et casser la pointe de la pipette, la plonger dans de la gélatine stérile et qu'on vient de porter à l'ébullition. Aspirer la gélatine dans la pipette jusqu'à l'étranglement *a*. Sceller au chalumeau l'effilure et l'étranglement. Plonger le tube obtenu dans de l'eau froide pour le refroidir rapidement.

3° La solidification de la gélatine étant complète, flamber rapidement la pointe *a*, en casser l'extrémité avec une pince et, par l'orifice, ensemencer par piqûre avec un fil de platine fin ; refermer l'effilure au chalumeau.

4° Pour ouvrir le tube, la culture étant terminée, il faut commencer par casser la pointe inférieure au-dessus d'un verre flambé. Si l'on ouvrait d'abord le tube à sa partie supérieure, par suite de la

pression des gaz dégagés par la culture, la gélatine pourrait être projetée à la face de l'opérateur.

D. **Procédé par l'hydrogène** (**Roux**). — 1° Un tube à essai contenant de la gélatine stérilisée et bouché à l'ouate est étranglé au-dessous du bouchon dans la flamme du chalumeau (*a*, fig. 79).

2° Relier, par un tube de caoutchouc, au générateur d'hydrogène, une pipette Pasteur B, coudée à angle droit au-dessous du tampon d'ouate et dont la pointe effilée puisse pénétrer aisément dans l'étranglement du tube de gélatine.

3° La gélatine étant liquéfiée au bain-marie, flamber et briser l'extrémité effilée de la pipette, puis plonger cette effilure dans la gélatine en l'insinuant entre la paroi du tube et le tampon d'ouate.

4° Faire barboter pendant plusieurs minutes l'hydrogène ; puis soulever le tube effilé et laisser circuler le courant d'hydrogène au-dessus de la gélatine pour empêcher l'introduction de l'air pendant qu'on solidifie le milieu par un refroidissement rapide.

5° Soulever le tampon d'ouate et ensemencer par piqûre avec un fil de platine fin, le courant d'hydrogène passant toujours.

6° L'ensemencement terminé, retirer le tube à hydrogène et sceller rapidement au chalumeau au niveau de l'étranglement *a*.

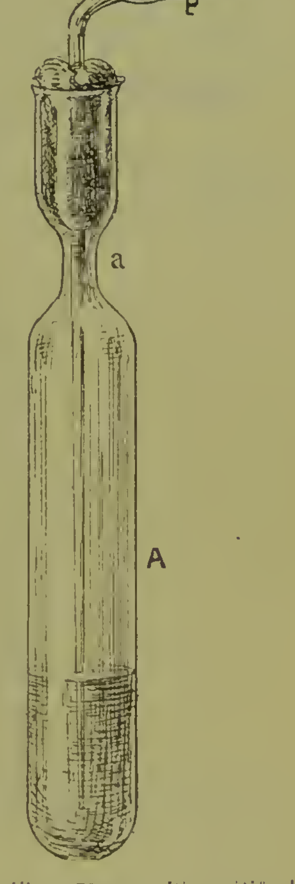


Fig. 79. — Dispositif de Roux pour la culture des anaérobies en gélatine.

II. — ENSEMENCEMENTS EN STRIE.

GÉLATINE ET GÉLOSE.

Tube de Roux. — Le tube de Roux pour culture en strie est un tube à essai étiré à sa partie supérieure A et portant une tubulure latérale B (fig. 80).

1° Avec un entonnoir à tige effilée, verser de la gélatine nutritive au fond du tube ; fermer *a* à la lampe ; munir B d'un tampon d'ouate compris entre deux étranglements. Stériliser le tube à l'autoclave.

2° Liquéfier la gélatine à basse température, relier B à la trompe à eau, faire le vide et pratiquer des lavages à l'hydrogène (la gélatine est maintenue liquide pendant ces opérations).

3° Le tube étant privé d'air et rempli d'hydrogène, le coucher

de manière que la gélatine se solidifie en surface inclinée.

4° La solidification obtenue, flamber et briser la pointe de la tubulure *a*; par cette tubulure, pratiquer avec l'öse l'ensemencement en strie, puis sceller de nouveau *a*. Pendant l'ensemencement, la tubu-

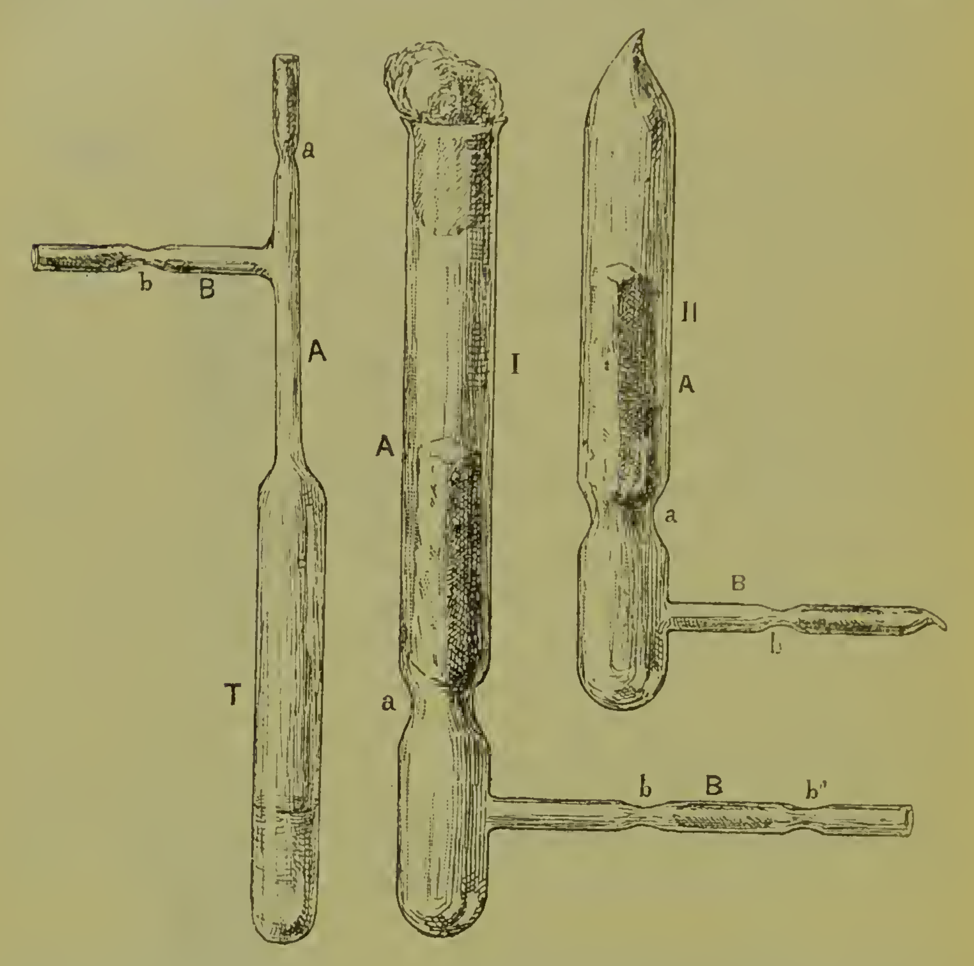


Fig. 80. — Tube de Roux pour ensemencement en strie.

Fig. 81. — Tube de Roux pour les cultures anaérobies sur pomme de terre.

lure B reste en communication avec le générateur d'hydrogène; ce gaz s'échappe par *a* et empêche l'air de pénétrer dans le tube;

5° Il ne reste plus qu'à sceller au niveau de l'étranglement *b* : la culture se produit dans une atmosphère d'hydrogène; on peut aussi faire de nouveau le vide dans l'appareil avant de sceller en *b*.

POMME DE TERRE.

Tube de Roux. — 1° Au tube ordinaire pour les cultures sur pomme de terre, souder, au-dessous de l'étranglement, un tube

latéral B, dans lequel on place un tampon d'ouate (fig. 81). On trouve dans le commerce des tubes ainsi préparés.

Introduire un morceau de pomme de terre dans le tube et stériliser à 120° à l'autoclave.

2° Ensemencer la pomme de terre selon le procédé ordinaire, puis fermer à la lampe l'extrémité supérieure du tube A au-dessous du tampon d'ouate (fig. 81-II).

3° Relier B à la trompe, faire le vide, laver à l'hydrogène.

4° Sceller au chalumeau, sous le vide, la tubulure B au niveau de son étranglement *b'* et porter l'appareil à l'étuve.

III. — ISOLEMENT DES ANAÉROBIES.

A. **Procédé des plaques**. — Ce procédé, d'exécution difficile, permet d'obtenir des plaques semblables à celles que l'on prépare

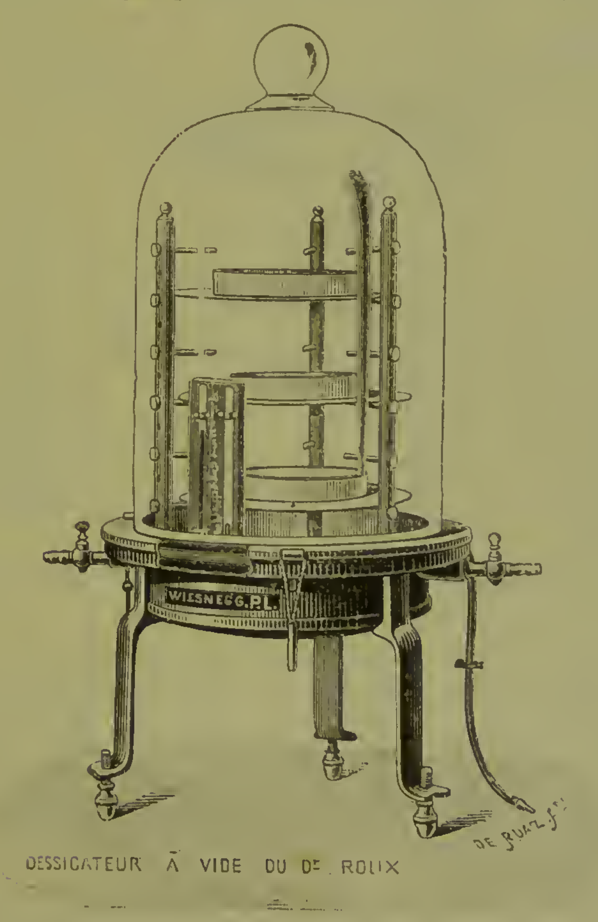


Fig. 82. — Cloche pour cultures et évaporations dans le vide.

avec les microbes aérobies et que l'on peut facilement porter sous le microscope.

1° Ensemencer avec le microbe à étudier trois tubes de gélatine stérilisée et liquéfiée et préparer trois plaques comme il a été dit pour la séparation des aérobies (p. 84).

2° Tenir préparée d'avance la cloche à dessécher dans le vide (après lavage au sublimé) ou une étuve à vide (Voy. plus loin) et placer dans son récipient à acide sulfurique une solution de pyrogallate de potasse (Voy. p. 96).

3° A mesure de leur confection, disposer les plaques sur l'étagère, à l'intérieur de la cloche.

4° Luter la cloche, y faire le vide, pratiquer des lavages à l'hydrogène ; isoler la cloche en fermant le robinet qui la relie à la trompe.

B. **Boîte de Kitasato.** — C'est une boîte de verre, plate et circulaire, des dimensions d'une boîte de Petri et portant deux tubulures



Fig. 83. — Boîte de Kitasato.

latérales A et B. La tubulure B est effilée et fermée à la lampe ; la tubulure A est bouchée par un tampon de coton.

1° Stériliser la boîte au four Pasteur.

2° Flamber et casser la pointe de l'effilure B, la plonger dans un tube de gélatine ensemencée et aspirer par A de manière à faire pénétrer la gélatine dans la boîte. Sceller de nouveau B et laisser solidifier la gélatine.

3° Relier A à la trompe, faire le vide, laver à l'hydrogène, sceller au niveau de l'étranglement *a*.

L'appareil de Kitasato est bon, mais coûteux et fragile.

C. **Tube d'Esmarch modifié par Fraenkel.** — 1° Prendre trois tubes à essai à parois minces, de 3 à 4 centimètres de diamètre et sans rebord saillant à l'orifice ; chaque tube reçoit une petite quantité de gélatine, est bouché à l'ouate puis stérilisé à l'autoclave.

2° Préparer pour chaque tube à essai un bouchon de caoutchouc à deux trous portant deux tubes de verre coudés à angle droit à l'extérieur et dont l'un plonge jusqu'au fond du tube à essai, tandis que l'autre s'arrête au-dessous du bouchon ; la partie extérieure de chaque tube porte un tampon d'ouate entre deux étranglements

(fig. 84). Envelopper dans plusieurs doubles de papier filtre chaque bouchon muni de ses deux tubes et stériliser à l'autoclave.

3° La gélatine étant liquéfiée à basse température, ensemencer les trois tubes par la méthode des dilutions (Voy. p. 84).

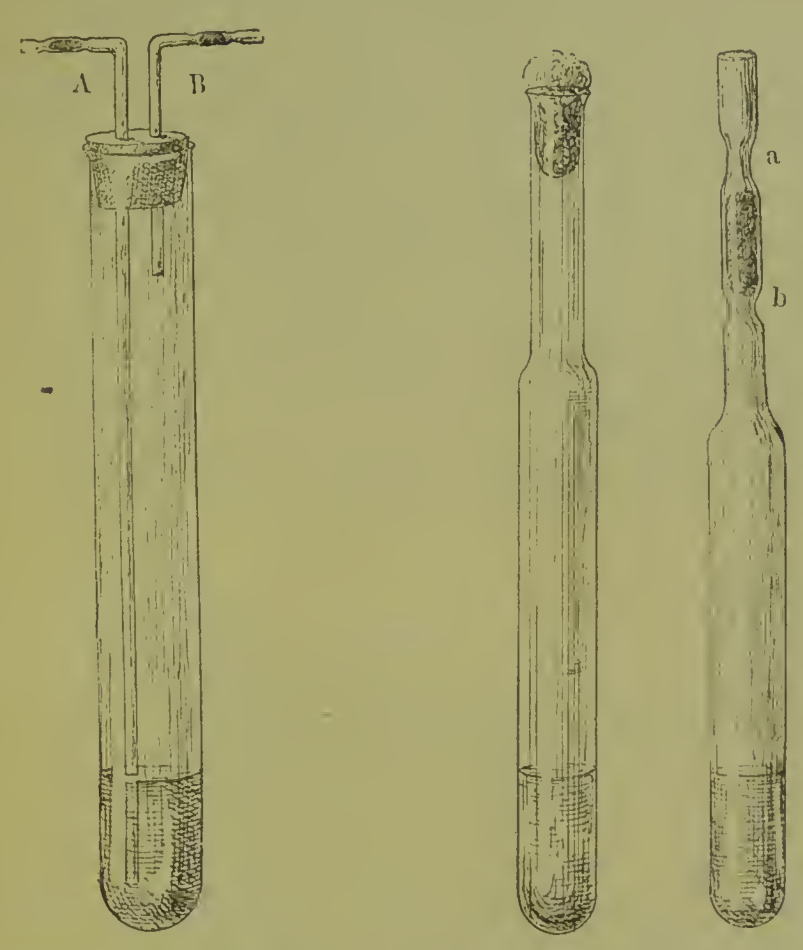


Fig. 84. — Tube de Fraenkel pour culture anaérobie en plaque roulée.

Fig. 85. — Préparation du tube de Roux pour culture anaérobie en plaque roulée.

4° Remplacer rapidement le tampon d'ouate de chaque tube par un bouchon de caoutchouc, sorti du papier au moment de l'employer, en ayant soin de ne pas toucher les parties qui pénétreront dans le tube à essai. Fixer le bouchon et le recouvrir de cire Golaz.

5° Relier le tube le plus long A à l'appareil à hydrogène et faire barboter le gaz pendant cinq à dix minutes dans la gélatine (maintenue liquide par immersion dans l'eau à 35°-40°) ; fermer alors au chalumeau les étranglements en A et en B.

6° Porter le tube sous un robinet d'eau froide et faire solidifier la gélatine sur les parois du tube en plaque enroulée d'Esmarch (Voy. p. 88).

D. **Tube d'Esmarch modifié par Roux.** — PROCÉDÉ RECOMMANDÉ. — 1° Dans un tube à essai de 3 centimètres de diamètre environ et rétréci à sa partie supérieure (fig. 85), verser avec un entonnoir à tige effilée quelques centimètres cubes de gélatine ; fermer l'orifice du tube avec un tampon d'ouate; stériliser à l'autoclave; laisser refroidir.

2° Liquéfier la gélatine à basse température, enlever le tampon d'ouate, ensemencer avec le fil de platine (ensemencer plusieurs tubes par le procédé des dilutions successives), replacer le tampon, le repousser dans le tube et étrangler celui-ci en *a* et en *b*.

3° Relier le tube à la trompe à eau ; faire le vide ; laver à l'hydrogène ; sceller en *a*, le tube étant rempli d'hydrogène.

4° Porter sous un robinet d'eau froide et enrouler la gélatine.

Pour les prélèvements, on coupe le tube circulairement à sa partie supérieure et on fait pénétrer un fil de platine par l'ouverture.

E. **Tube à hydrogène.** — Cet appareil est constitué par un tube de verre long de 25 centimètres, ayant 3 à 4 centimètres de diamètre et portant à chacune de ses extrémités un tube, *a* et *b*, de petit diamètre, recourbé à angle droit et bouché à l'ouate (fig. 86).



Fig. 86. — Tube de Roux pour culture en plaque dans l'hydrogène.

1° Stériliser l'appareil au four Pasteur.

2° Enlever le tampon d'ouate de la branche *a*, et par cette branche introduire avec une forte pipette Pasteur la gélatine ensemencée en quantité suffisante pour remplir la moitié inférieure du tube A.

3° Étrangler les deux tubes *a* et *b* de part et d'autre du tampon d'ouate; plonger le tube A dans un vase plein d'eau à 35°-40° pour maintenir la gélatine liquide.

4° Relier *a* au générateur d'hydrogène ; le gaz circule dans le tube, barbote dans la gélatine et sort par *b* ; au bout de quelques minutes laisser refroidir la gélatine, le gaz continuant à passer, et sceller *a*, et *b* au niveau des étranglements.

On peut encore utiliser le tube représenté par la figure 87 ; le maniement est le même que pour le précédent.

F. **Tube de Vignal.** — PROCÉDÉ RECOMMANDÉ. — 1° Prendre un

tube de verre de 3 à 4 millimètres de diamètre et de 1 mètre de long; en effiler une extrémité, boucher l'autre avec un tampon d'ouate et faire un étranglement à 3 ou 4 centimètres au-dessous (fig. 88, partie gauche). Stériliser le tube ainsi préparé en le chauffant fortement dans la flamme.

2° Porter à l'ébullition (après coloration facultative par le sulfo-indigotate de soude) un tube de gélatine stérilisée; le laisser refroidir sous un courant d'hydrogène (Voy. p. 107); avant solidification, ensemencer en continuant à laisser passer le gaz inerte; mélanger par un mouvement rapide de rotation entre les deux mains.



Fig. 87. — Tube pour culture en plaque dans l'hydrogène. Fig. 88. — Tube de Vignal.

3° Flamber et casser la pointe effilée du tube de Vignal; plonger cette pointe dans la gélatine et aspirer par la partie supérieure de façon à remplir le tube jusqu'à l'étranglement A. Agir avec précaution pour ne laisser pénétrer aucune bulle de gaz dans le tube; sceller au chalumeau l'effilure, puis l'étranglement A.

Les colonies se développent bientôt, disséminées dans la gélatine

pour effectuer les prélèvements, flamber légèrement le tube ou le laver au sublimé puis à l'alcool au niveau de la colonie à étudier ; le couper à ce niveau et prélever avec l'öse.

§ 3. — EMPLOI DES ÉTUVES A VIDE.

Pour la culture des anaérobies, on peut utiliser les vases à cultures ordinaires, à la condition d'enfermer ces vases dans une étuve spéciale où l'on fait et maintient le vide. L'étuve à vide devra toujours contenir une couche d'eau pour empêcher la dessiccation des milieux de culture ; on remplace avec avantage l'eau par la solution de pyrogallate de potasse, qui a la propriété d'absorber l'oxygène.

A propos de l'isolement sur plaques, nous avons décrit l'utilisation de la *cloche à vide de Roux*. On peut encore employer les appareils suivants :

1° **Appareil de Trétrop.** — Convient pour les cultures à la température ordinaire. Il se compose d'un cylindre en verre fermé

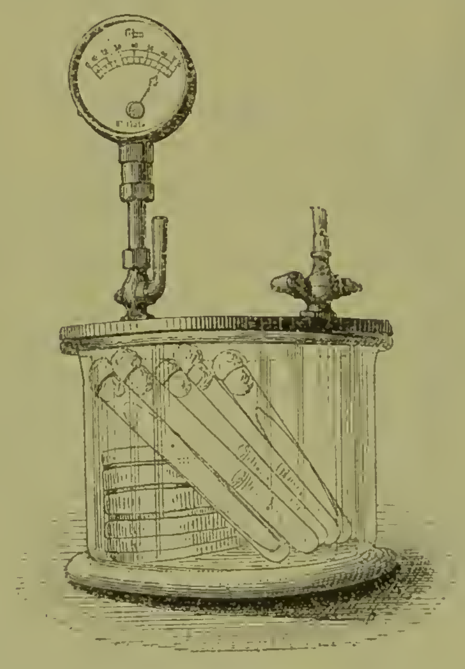


Fig. 89. — Appareil de Trétrop pour cultures dans le vide.

par un couvercle de bronze muni d'un manomètre à vide et d'une tubulure à robinet (fig. 89).

a. Garnir le fond de l'appareil avec la solution de pyrogallate de potasse ; disposer les vases de culture ; placer et luter le couvercle.

b. Relier la tubulure à la trompe à eau, faire le vide, pratiquer

des lavages à l'hydrogène, puis fermer le robinet sous le vide.

2° **Étuve à vide de Wiesnegg**. — Cet appareil constitue une véritable étuve de Roux, à parois résistantes, hermétiquement close au moyen d'une porte A à joint de caoutchouc et munie d'un régu-

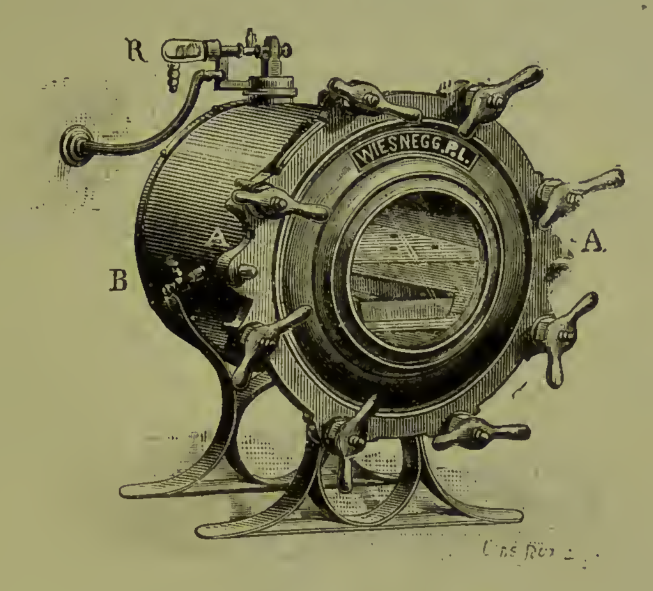


Fig. 90. — Étuve à vide de Wiesnegg.

lateur et d'un brûleur (fig. 90). Il est utilisable pour toutes les températures. On dispose sur les tablettes de l'étuve les vases de culture et une cuvette contenant la solution de pyrogallate de potasse ; on ferme, fait le vide et pratique les lavages à l'hydrogène. Le réglage de la température se fait comme pour l'étuve de Roux.

CHAPITRE VII

LE MICROSCOPE ET SES ACCESSOIRES

Les recherches bactériologiques exigent l'emploi d'un bon microscope, fournissant des grossissements de 600 à 1200 diamètres ; on a rarement l'occasion d'utiliser un microscope plus puissant ; le *Microbe de la péripneumonie* n'est visible qu'avec un grossissement de 2000 diamètres.

Le *statif* du microscope doit être lourd et stable, muni d'une crémaillère pour les mouvements rapides et d'une vis micrométrique pour les mouvements lents. Le tube porte un revolver pour deux ou trois objectifs ; la platine en ébonite doit être large ; il est avantageux de posséder une platine tournante et pouvant être centrée. Le pied doit être muni d'une charnière permettant d'incliner le corps du microscope et d'un appareil d'éclairage possédant un miroir, plan d'un côté, concave de l'autre, et pouvant recevoir un condensateur Abbé. Les diaphragmes seront du type *cylindrique* ou *iris*.

La *partie optique* du microscope est celle dont le choix présente le plus de difficultés. Pour les recherches courantes, il suffit de posséder deux oculaires (I ou II et III), et quatre objectifs, 2, 6, 8 ou 9 à sec, et 1/12 à immersion homogène ; parfois on utilise l'objectif 1/18 à immersion homogène. Ces numéros s'appliquent aux instruments français et à ceux de Reichert, à Vienne, et Leitz, à Wetzlar ; les objectifs de Zeiss correspondants sont AA, DD, E, à sec et 1/12 à immersion homogène. Les préparations reproduites dans cet ouvrage ont été dessinées à la chambre claire sous un microscope Reichert.

Il faut posséder, en outre, une chambre claire, un micromètre objectif et un oculaire micrométrique.

Article I. — CHOIX DES OBJECTIFS.

Un objectif doit remplir certaines conditions que nous allons étudier.

A. — GROSSISSEMENT.

Par grossissement d'un système optique, on entend le grossissement en diamètres. Les fabricants de microscopes livrent avec leurs appareils une table donnant les grossissements réalisés par les diverses combinaisons d'objectifs et d'oculaires; on vérifie, à l'aide d'un des deux procédés suivants, les indications fournies par cette table.

Remarque. — Le grossissement variant avec la distance qui sépare l'objectif de l'oculaire, on opérera toujours avec une même longueur de tube. Les microscopes ordinairement employés possèdent un tube à tirage sur lequel est gravée une échelle divisée en millimètres; il est de règle de donner au tube une longueur de 160 millimètres, ce que l'on obtient en sortant le tube à tirage jusqu'à ce que la division 160 affleure la douille du tube fixe (microscope muni du revolver).

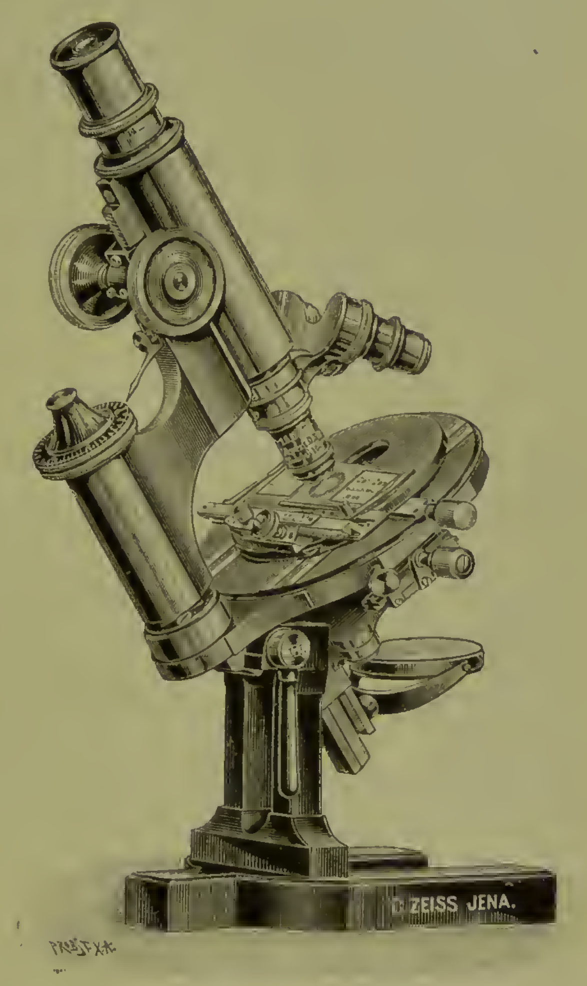


Fig. 91. — Microscope.

A. Méthode de la chambre claire. — Elle exige l'emploi de la chambre claire et du *micromètre objectif*, lame de verre mince sur laquelle ont été tracées avec la machine à diviser des stries parallèles espacées de 1/100 millimètre. Opérer de la façon suivante :

1° Le microscope étant muni du système optique dont on veut mesurer le grossissement, le tube étant tiré à 160 millimètres, placer sur la platine le micromètre objectif et mettre au point : on aperçoit alors nettement les divisions du micromètre.

2° Disposer au niveau et sur le côté droit de la platine une plan-

chette couverte d'un papier, bleuâtre de préférence; placer sur l'oculaire la chambre claire.

3° En regardant dans le microscope on perçoit deux images du micromètre : l'une est fournie directement par les rayons traversant la chambre claire sans réfraction, l'autre est projetée par le prisme sur le papier. Si l'on approche la pointe d'un crayon de l'image des divisions sur le papier, l'œil perçoit aussi la pointe du crayon; il est aisé dès lors de fixer sur le papier, d'un trait de crayon, la position de quelques-unes de ces divisions.

4° Cela fait, on mesure directement, à l'aide d'une règle divisée en millimètres, la distance qui sépare deux des divisions tracées sur le papier; soit n le nombre de millimètres obtenu, sachant que chaque division du micromètre mesure 1/100 millimètre, et en appelant G le grossissement du système optique, on a :

$$\frac{1}{100} \times G = n.$$

D'où

$$G = n \times 100.$$

Si, par exemple, l'intervalle entre deux divisions mesure 5 millimètres, on obtiendra ;

$$G = 5 \times 100 = 500.$$

Ce qu'on exprime en disant que le grossissement est de 500, ou plus exactement de 500 diamètres.

On peut encore à l'aide de la chambre claire projeter directement les divisions grossies du micromètre sur une règle divisée en millimètres et placée au niveau de la platine du microscope, on noterait alors le nombre n des divisions de la règle recouvertes par m divisions micrométriques, et l'on appliquerait la formule :

$$G = 100 \frac{n}{m}.$$

Si, par exemple, 3 divisions du micromètre couvrent 15 divisions de la règle, on a :

$$G = 100 \times \frac{15}{3} = 500.$$

La méthode de la chambre claire est très rapide, mais a l'inconvénient de ne donner que des résultats approximatifs; les évaluations qu'elle fournit sont un peu supérieures à la réalité.

B. **Méthode de l'oculaire micrométrique.** — L'oculaire micrométrique est constitué par une lame de verre où sont tracés des traits parallèles espacés de 1/10 millimètre et qui est placée dans un oculaire entre la lentille de champ et la lentille frontale.

On connaît d'avance le grossissement de l'oculaire (10^d d'ordinaire); chaque division de l'échelle vue à travers l'oculaire vaut dès lors 1/10 millimètre × 10 = 1 millimètre.

1° Placer sur la platine du microscope le micromètre objectif; mettre en place l'oculaire micrométrique et l'objectif à étudier, tirer le tube à 160 millimètres. Mettre au point et faire coïncider, en déplaçant le micromètre objectif, ses divisions avec celles de l'oculaire.

2° Constater combien une division du micromètre objectif couvre de divisions de l'oculaire; en appelant n ce dernier nombre, on a :

$$\frac{1}{100} \times G = n.$$

D'où

$$G = n \times 100.$$

Si, par exemple, 5 divisions de l'oculaire sont couvertes par une de l'objectif, on obtient :

$$G = 5 \times 100 = 500.$$

B. — CORRECTION DE L'ABERRATION DE RÉFRANGIBILITÉ.

Pour éviter la décomposition de la lumière blanche par les lentilles de l'objectif, chacune de celles-ci est composée de deux verres, l'un plan concave, l'autre convexe. La lentille convergente est en *crown*, qui disperse peu; la divergente en *flint* qui disperse beaucoup; en donnant à ces deux lentilles une épaisseur convenable, on corrige l'aberration (*lentilles achromatiques*). L'achromaticité, toutefois, n'est jamais complète; aussi voit-on les objets étudiés au microscope, tantôt avec des contours bleuâtres (correction par excès, la plus ordinaire), tantôt avec des contours jaunâtres (correction par défaut). Il faut s'assurer, en choisissant un objectif, que l'aberration en est minime.

C. — POUVOIR RÉSOLVANT.

Le *pouvoir résolvant* d'un objectif permet de voir la plus grande quantité possible de stries fines; il est très important que les objectifs utilisés en bactériologie possèdent ce pouvoir à un haut degré.

Le pouvoir résolvant est en rapport direct avec l'*angle d'ouverture* de l'objectif. L'angle d'ouverture est l'angle formé par les deux rayons extrêmes qui, partant d'un même point de l'objet à examiner, peuvent arriver à l'œil de l'observateur. Plus cet angle est grand, plus est considérable la quantité de rayons lumineux qui arrivent d'un même point à l'œil observateur, et par conséquent mieux est définie la situation des différents points qui composent l'objet.

Il y a un grand intérêt à donner aux objectifs, particulièrement pour les forts grossissements, un angle d'ouverture aussi grand que possible; on arrive aujourd'hui à construire des objectifs possédant des angles d'ouverture de 140° à 180°.

Pratiquement, on caractérise les objectifs moins par leur angle d'ouverture que par leur *ouverture numérique*, c'est-à-dire la propriété de recevoir le plus grand nombre de rayons émanés du même point, ou, en un mot, la mesure de l'intensité lumineuse de l'objectif. Le pouvoir résolvant augmente avec l'ouverture numérique. Les bons objectifs portent, gravée sur le manchon, l'indication de leur ouverture numérique. On peut déterminer cette ouverture numérique *a*, en appliquant la formule :

$$a = n \text{ sinus } \frac{1}{2} i.$$

n, représentant l'angle d'ouverture, se mesure à l'aide d'un instrument spécial, l'*apertomètre*, sur le maniement duquel nous ne pouvons insister ici.

Le *pouvoir définissant* d'un objectif est la propriété de montrer nettement les contours des objets; il est fonction des corrections des aberrations de sphéricité (emploi des diaphragmes) et de réfrangibilité (emploi des objectifs achromatiques).

En pratique, on évalue les pouvoirs résolvant et définissant d'un objectif à l'aide des *test-objets* constitués par des préparations de diatomées. Un bon objectif doit montrer clairement les stries fines et nettement les contours des diatomées examinées.

Ces diatomées sont d'ordinaire : *Pleurosigma angulatum*, *Grammatophora subtilissima*, *Navicula crassinervis*, *Surirella gemina*, etc. ; avec *Pleurosigma angulatum*, le plus fréquemment employé, on doit voir, pour un grossissement de 500-600 diamètres et une ouverture numérique de 1,20 à 1,25, une nervure centrale à laquelle viennent aboutir de part et d'autre deux systèmes de lignes obliques se coupant à angle aigu et déterminant de petits polygones réguliers; un bon objectif donne une image très nette à contours bien distincts.

Il est bon d'examiner avec l'objectif à l'épreuve des préparations de microbes de petite taille, tels que le Bacille tuberculeux; on se rendra ainsi compte du grossissement et de la netteté de l'objectif.

D. — CLARTÉ.

La clarté dépend de la correction des aberrations et de l'ouverture numérique; un bon objectif doit être clair, le champ doit être large, blanc, et uniformément éclairé.

E. — LONGUEUR DU FOYER.

L'angle d'ouverture ne peut être considérable que si l'objectif a un très court foyer. Ces objectifs forts ont nécessairement une dis-

tance focale assez courte (2 millimètres environ pour les objectifs 9 et 1/12) ; mais un objectif ne doit jamais avoir besoin de toucher le couvre-objet pour être au point, à plus forte raison faudrait-il rejeter tout objectif dont le foyer serait trop court pour que l'on puisse observer les objets recouverts avec un couvre-objet ordinaire.

Article II. — SOINS A DONNER AU MICROSCOPE.

Le microscope sera conservé à une température moyenne, loin de toute source de chaleur et à l'abri des rayons directs du soleil : une température trop élevée ferait fondre le baume du Canada qui relie les diverses parties des lentilles et mettrait les objectifs hors d'usage. Il faut aussi protéger le microscope contre les poussières ; le mieux est de le placer sur la table de travail sur un morceau de feutre épais et de le recouvrir avec une cloche de verre.

Toute observation doit être pratiquée avec des lentilles excessivement propres : la lentille de l'objectif, celles de l'oculaire seront toujours essuyées avec un linge fin avant de servir à un examen.

Quand on aperçoit des grains de poussière dans le champ du microscope, on recherche l'endroit où ils se trouvent de la façon suivante : on fait tourner l'oculaire sur lui-même dans le tube ; si les grains de poussière sont sur les lentilles de l'oculaire, ils se déplacent avec celui-ci ; s'ils restent immobiles, ils sont situés sur l'objectif. On examinera les lentilles à quelque distance de l'œil, contre la lumière; on verra ainsi si elles sont couvertes de buée, si des grains de poussière y adhèrent, etc.

On nettoie la lentille frontale de l'objectif en la frottant doucement par un mouvement circulaire avec un linge très propre et très fin ; si ce nettoyage est insuffisant, on casse un morceau de moelle de sureau, de façon à obtenir une surface de section fraîche, on applique le centre de cette surface contre la lentille et on communique à l'objectif un mouvement de rotation en appuyant légèrement.

Quand la lentille est souillée par de l'huile de cèdre, du baume du Canada, de la résine Damar, on dépose une goutte de xylol sur un linge fin et on frotte doucement la lentille avec le linge ainsi imbibé. On doit se garder de mouiller trop fortement le linge ou de verser du xylol sur l'objectif : le réactif, pénétrant entre la monture et la lentille, pourrait dissoudre le baume qui relie les verres de l'objectif et mettre l'instrument hors d'usage.

Quand on examine les préparations dans des réactifs chimiques (potasse caustique, acides, etc.), il faut éviter que ces réactifs ne

viennent au contact des lentilles ; si cet accident se produisait, laver de suite l'objectif à l'eau distillée et le sécher avec un linge fin.

Si l'objectif se trouble et que le nettoyage de la lentille extérieure ne suffise pas à lui rendre sa clarté, il ne faut pas le dévisser pour nettoyer les lentilles intérieures, mais l'envoyer au constructeur qui seul peut le rétablir dans son état primitif.

Il faut éviter soigneusement d'exposer les objectifs à des chocs ou à des chutes, aussi légers qu'ils puissent être.

Le nettoyage de l'oculaire et du condensateur Abbé se fera de la même façon que celui de l'objectif, mais ici les lentilles sont beaucoup plus abordables et infiniment moins délicates; on nettoiera de même les miroirs d'éclairage.

Après chaque examen, avant de replacer le microscope sous la cloche, les oculaires et objectifs seront essuyés; l'objectif à immersion sera débarrassé de toute trace d'huile de cèdre.

Le statif sera fréquemment essuyé avec une peau de chamois; on frottera toujours dans le sens suivant lequel le vernis a été appliqué. Éviter de souiller le statif avec le baume, l'huile de cèdre; si cette souillure se produisait, frotter très légèrement avec un linge humecté de xylol et essuyer immédiatement avec la peau de chamois; ne pas mettre un excès de xylol et ne pas prolonger le contact du réactif, sans quoi on enlèverait le vernis qui recouvre le métal.

La platine en ébonite se nettoie avec un linge imbibé de xylol.

De temps en temps on doit lubrifier les vis et les charnières avec un peu de vaseline.

Article III. — MANIEMENT DU MICROSCOPE.

Pour pratiquer les observations, on place le microscope sur une table massive, devant une fenêtre ; on prend la lumière sur un ciel clair ou sur un mur blanc, sans utiliser directement les rayons solaires.

A défaut de lumière naturelle, on emploie l'éclairage artificiel obtenu au moyen d'une bonne lampe à pétrole à courant d'air ou mieux d'une lampe à albo-carbone ; dans ce cas, il est parfois nécessaire d'interposer entre la source de lumière et le microscope une lame en verre dépoli pour rendre l'éclairage moins intense.

A. — ÉCLAIRAGE.

Tourner le microscope du côté de la lumière, saisir le miroir par ses parties latérales et l'incliner dans les différentes directions jusqu'à ce que l'œil placé sur l'oculaire voie le champ du microscope bien éclairé.

1° Quand on se sert des objectifs à sec, utiliser le miroir concave qui projette un faisceau de rayons convergeant au point où est placé l'objet à examiner.

2° Quand on utilise l'objectif à immersion, il faut placer sous la platine le *condensateur Abbé* qui transforme en un faisceau convergent, dont le foyer se trouve au niveau de l'objet, les rayons parallèles que lui envoie un miroir plan ; cet appareil donne un éclairage considérable. *Avec le condensateur, il faut toujours utiliser le miroir plan.*

Toujours placer un diaphragme sous la platine ; le choix du diaphragme dépend du grossissement que l'on utilise : plus l'objectif est puissant, plus l'ouverture du diaphragme doit être petite. Le diaphragme corrige l'aberration de sphéricité et rend les images plus nettes en retenant les rayons marginaux, inutiles ou nuisibles.

B. — DISPOSITION DE L'OBJET.

L'objet à examiner est placé sur une lame de verre mince, très transparente et sans bulles, dite porte-objet ; il est recouvert par une lamelle de verre dite couvre-objet, de forme carrée, de 18 à 25 millimètres de côté et dont l'épaisseur ne dépasse pas $0^{mm},15$ à $0^{mm},20$.

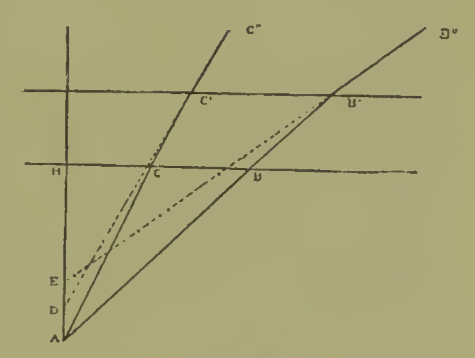


Fig. 92. — Déviation des rayons lumineux par leur passage à travers la lamelle couvre-objet.

Les rayons lumineux émanant de l'objet subissent, en traversant le couvre-objet, une déviation plus ou moins grande selon l'épaisseur de cette lamelle. Comme le montre la figure 92, étant donné un point A de l'objet, son image, par suite de la déviation, se fera sur toute la ligne DE et sera diffuse. Avec les forts grossissements surtout, la clarté et la netteté de l'image seront considérablement diminuées.

Pour remédier à cet inconvénient, il faudrait n'employer que des lamelles d'une épaisseur donnée, pour laquelle seraient réglés les objectifs ; en pratique, on ne peut obtenir des lamelles toujours identiques et on préfère munir les objectifs d'une certaine puissance d'une *correction* qui permet de modifier la distance entre les lentilles composant l'objectif : plus la lamelle est épaisse, plus il faut rapprocher les lentilles, ce qui, d'autre part, diminue la distance focale et augmente le grossissement.

L'importance de la correction est d'ailleurs moins grande aujour-

d'hui, car tous les microscopes possèdent un tube à tirage : en faisant varier la longueur du tube, on peut corriger, dans de certaines limites, l'influence de l'épaisseur de la lamelle. Le tube doit être d'autant plus court que la lamelle est plus épaisse ; le tube étant complètement rentré, on peut utiliser des lamelles de 0mm,25 d'épaisseur, alors qu'avec la longueur normale du tube (160 millimètres), on emploie des couvre-objets de 0mm,15 à 0mm,20.

C. — OBJECTIFS A IMMERSION HOMOGÈNE (1).

L'immersion a pour but de s'opposer à la déviation des rayons lumineux lors de leur passage du verre dans l'air. On pratique l'immersion homogène en reliant la lentille frontale de l'objectif à la lamelle couvre-objet au moyen d'une goutte d'un liquide dont l'indice de réfraction est très voisin de celui du verre (*huile de cèdre* : 1,515 à 1,520 ; *mélange d'huile de ricin et d'essence d'anis* : 1,510 environ ; *monobromonaphtaline* : 1,66). Les objectifs à immersion homogène n'ont pas besoin de correction.

Quand des rayons lumineux passent de la lamelle dans l'air, ils subissent une déviation telle que tout rayon frappant la surface du verre sous un angle inférieur à 41°,48 sort parallèlement à la surface de la lamelle et est perdu pour l'objectif : en substituant à l'air une substance de même indice que le verre, on évite cette perte de lumière. L'emploi de l'immersion augmente considérablement la netteté de l'image : c'est ainsi qu'un objectif à immersion homogène dont l'angle d'ouverture mesure 82° a la même valeur (ouverture numérique) qu'un objectif à sec dont l'angle d'ouverture serait de 180°. De plus, pour un même grossissement, l'objectif à immersion a une distance focale plus grande que l'objectif à sec.

L'usage de l'objectif à immersion nécessite l'emploi du condensateur Abbé et ne donne des résultats parfaits que pour une longueur donnée du tube du microscope (160 millimètres d'ordinaire). On dépose sur la lamelle une goutte de l'huile de cèdre fournie par le constructeur de l'objectif et on abaisse celui-ci jusqu'à ce que sa lentille frontale vienne au contact de la goutte d'huile.

L'objectif à immersion sera réservé à l'étude des préparations colorées ; il n'est pas applicable à l'examen des microbes non colorés, car la lumière intense fournie par le condensateur noie les objets incolores et en rend les contours très vagues.

(1) Nous laisserons de côté les objectifs à immersion à eau, peu employés aujourd'hui.

D. — REVOLVER.

Le revolver le plus employé est construit pour trois objectifs ; on le munit des nos 2, 8 ou 9 et 1/12 à immersion homogène ; il faut visser ces objectifs sur le revolver à leur véritable place, indiquée par un chiffre gravé sur la paroi de l'instrument ; cette précaution est indispensable pour obtenir un bon centrage ; le mouvement de rotation du revolver permet de faire passer les différents objectifs sous le tube du microscope sans avoir jamais à les dévisser.

E. — OCULAIRES.

Dans la grande majorité des cas il faut employer des oculaires faibles, les oculaires forts n'augmentant le grossissement qu'aux dépens de la clarté et de la netteté de l'image ; les oculaires I ou II sont d'un usage courant ; on n'utilise les nos III et IV que dans certaines recherches délicates exigeant un grossissement considérable.

F. — MISE AU POINT.

La mise au point comporte deux temps : 1° la recherche du foyer approximatif ; 2° la recherche du foyer exact.

La *distance focale* varie avec les divers objectifs et est d'autant plus faible que le grossissement est plus fort. On s'habituera à connaître approximativement cette distance pour chaque objectif, de façon à effectuer rapidement le premier temps de la mise au point.

La mise au point approximative se fait à l'aide de la crémaillère pour mouvements rapides ; la recherche du point exact est effectuée avec la vis micrométrique qui commande les mouvements lents.

Quand on emploie de forts grossissements, l'objectif se trouve très près du couvre-objet et un mouvement brusque imprimé de haut en bas au tube du microscope briserait infailliblement la préparation : pour éviter cet accident, il faut opérer ainsi qu'il suit :

1° Avant d'appliquer l'œil sur le microscope, abaisser lentement le tube à l'aide de la crémaillère jusqu'à ce que la lentille frontale arrive au contact du couvre-objet : regarder directement la préparation pendant tout ce temps.

2° Alors seulement placer l'œil sur l'oculaire, et en tournant la crémaillère en sens inverse, effectuer la mise au point approximative.

3° Saisir la vis micrométrique, et en imprimant à celle-ci de très légers mouvements, achever la mise au point.

La vis micrométrique ne doit jamais servir à effectuer des mouvements étendus ; cette vis, très sensible et très délicate, agit sur le tube du micros-

cope par l'intermédiaire d'un ressort à boudin que de grandes incursions mettraient rapidement hors d'usage.

Pendant toute la durée de l'observation le pouce et l'index de la main droite ne quitteront pas la vis micrométrique et lui imprimeront constamment de très minimes déplacements : on arrive ainsi, sans mettre en jeu l'accommodation, à juger des reliefs, à voir successivement les différents plans de l'objet examiné, et par conséquent à se rendre un compte exact de sa forme.

Quand on étudie une préparation, la main gauche ne quitte pas le porte-objet et le fait glisser sur la platine de façon à en faire passer les différents points sous le champ du microscope suivant les besoins de l'observation.

Article IV. — MENSURATION DES OBJETS MICROSCOPIQUES.

La mensuration des objets microscopiques s'impose fréquemment au bactériologiste.

On adopte comme unité dans les mensurations microscopiques le millième de millimètre que l'on désigne par la lettre μ. On dira, par exemple, que le Bacille tuberculeux mesure $1\mu,5$ à $3\mu,5$ de long, sur $0\mu,2$ à $0\mu,4$ de large.

Les mensurations microscopiques peuvent s'effectuer par deux procédés différents.

A. **Emploi de la chambre claire**. — 1° A l'aide du micromètre objectif et de la chambre claire on détermine le grossissement G du système optique que l'on doit utiliser (Voy. p. 117).

2° On remplace le micromètre objectif par la préparation où se trouve l'objet à mesurer, et on dessine cet objet sur un papier disposé comme pour la détermination précédente.

3° On mesure sur le papier la longueur en millimètres du diamètre du dessin obtenu ; soit n cette longueur.

4° Les deux nombres G et n étant connus, on en déduit facilement le diamètre D de l'objet en appliquant la formule :

$$D = \frac{n}{G}.$$

Exemple. — Le grossissement d'un système optique est de 500 diamètres, le plus grand diamètre du dessin à la chambre claire d'un Bacille tuberculeux mesure $1^{mm},5$ de longueur ; on obtient en appliquant la formule :

$$D = \frac{1^{mm},5}{500} = 0^{mm},003 = 3\,\mu,$$

c'est-à-dire que la longueur du Bacille tuberculeux est de $3\,\mu$.

On peut à l'avance composer une table des grossissements de chacun des systèmes optiques dont on dispose ; l'opération de la mensuration se trouve ainsi simplifiée.

B. **Emploi du micromètre oculaire**. — 1° On examine le micromètre objectif en employant l'oculaire micrométrique et l'on constate que, avec l'objectif 8, par exemple, une division du micromètre objectif couvre 5 divisions de l'oculaire, ce qui revient à dire que 5 divisions de l'oculaire correspondent à un objet mesurant 1/100 millimètre et qu'une division de l'oculaire correspond à 1/500 millimètre, soit à 2 μ.

2° Remplacer le micromètre objectif par l'objet à mesurer; on constate que celui-ci couvre n divisions de l'oculaire.

3° Sachant qu'une division de l'oculaire correspond à un objet de 2 μ, et en appelant D le diamètre de l'objet, on a :

$$D = n \times 2\mu.$$

Si l'objectif couvre, par exemple, 2 divisions, on obtient :

$$D = 2 \times 2\mu = 4\mu.$$

Remarque. — On peut, à l'avance, dresser un tableau donnant la valeur en μ d'une division de l'oculaire micrométrique pour chacun des objectifs que l'on possède ; on n'a plus alors qu'à multiplier cette valeur par le nombre des divisions couvertes par l'objet. Pour les objectifs de Reichert, par exemple, on obtient la table suivante :

Avec l'objectif	2	une division de l'oculaire	micrométrique vaut	27 μ
—	4	—	—	11 μ
—	8	—	—	2 μ,2
—	9	—	—	1 μ,9
—	$\frac{1}{12}$	—	—	1 μ,8

Application. — Soit un objet qui, avec l'objectif 8, couvre 2 divisions de l'oculaire, on aura :

$$D = 2\mu,2 \times 2 = 4\mu,4.$$

Pour un objet vu avec l'objectif à immersion 1/12 et couvrant 3 divisions on aura de même :

$$D = 1\mu,8 \times 3 = 5\mu,4.$$

Il est aisé de comprendre qu'on arrivera à des mensurations d'autant plus exactes qu'on fera usage de grossissements plus forts : on réduit ainsi d'autant les erreurs d'observation.

Article V. — LAMES ET LAMELLES.

Les lames et les lamelles remplissant les conditions que nous avons exposées page 123 doivent être nettoyées avec soin.

Nettoyage. — A. Les lamelles neuves sont légèrement grasses et ne se laissent pas mouiller par l'eau ; avant de les employer il faut les laver à l'alcool à 95°, puis les essuyer avec un linge fin ne peluchant pas ; enfin, quand on veut obtenir une pureté parfaite, on passe plusieurs fois la lamelle dans la flamme chauffante d'un bec de Bunsen.

Pour essuyer les lamelles il faut avoir soin de ne jamais les tenir avec les deux mains; on les briserait ainsi infailliblement. Chaque lamelle placée dans un pli du linge doit être saisie et frottée entre le pouce et l'index de la main droite.

On doit avoir sur la table de travail un petit baquet de verre à couvercle contenant de l'alcool à 95° dans lequel trempe une provision de lamelles qui seront sorties de l'alcool et essuyées au moment même du besoin.

Les lames seront aussi lavées à l'alcool et essuyées avec soin.

B. — Les lames et les lamelles peuvent être utilisées plusieurs fois; il faut alors les laver soigneusement pour les débarrasser des produits qui y ont été déposés; faute de ce soin, on s'exposerait à de graves erreurs dans les observations ultérieures. Ce nettoyage, d'importance capitale, sera pratiqué ainsi qu'il suit :

1° Les lames et les lamelles sont recueillies après chaque manipulation dans un cristallisoir plein d'alcool à brûler; quand on en a un nombre suffisant, on procède au nettoyage.

2° Retirer les lames et lamelles de l'alcool, les placer dans une capsule en porcelaine et les couvrir avec une solution de carbonate de soude à 4 p. 100. Faire bouillir une dizaine de minutes.

3° Rejeter la solution alcaline, laver à grande eau, puis couvrir les lames et lamelles avec la solution suivante :

Eau	1 000	grammes.
Bichromate de potasse	20	—
Acide sulfurique	100	—

Faire bouillir pendant trente minutes.

4° Rejeter la solution acide, laver à grande eau, essuyer les lames et les lamelles et les placer séparément dans deux cristallisoirs couverts, pleins d'alcool à 95°, où on les prendra à mesure des besoins.

Ce procédé de nettoyage donne une sécurité entière.

Maniement. — Pour les manipulations, les lamelles sont saisies par un de leurs angles avec la *pince de Cornet* (fig. 93) ou la *pince de Debrandt*.

La pince de Debrandt, modification heureuse de celle de Cornet,

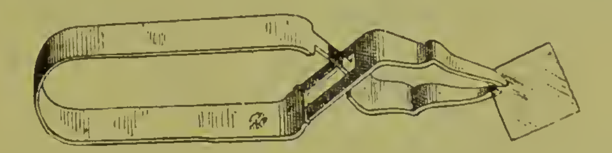


Fig. 93. — Pince de Cornet.

est bien équilibrée, bien en main ; elle est disposée de façon à servir indifféremment pour les lamelles et les lames, enfin elle donne une prise solide et ne brise pas les lamelles.

CHAPITRE VIII

EXAMEN MICROSCOPIQUE DES MICROBES PRÉLEVÉS DANS UNE CULTURE

L'examen microscopique des cultures doit être pratiqué selon deux modes différents :

a. On commence par étudier les microbes à l'état frais, sans coloration : une trace de la culture est portée sous le microscope et examinée immédiatement; on peut ainsi juger de la forme des microbes, reconnaître s'ils sont animés de mouvements, observer la modalité et la rapidité de ces mouvements.

b. Pour préciser les particularités morphologiques on a recours aux préparations colorées qui permettent d'employer de forts grossissements et font mieux ressortir les détails de structure des bactéries.

Article I. — **EXAMEN SANS COLORATION.**

Une gouttelette de la culture à examiner peut être placée entre une lame et une lamelle et portée sous le microscope ; mais, pour conserver les microbes vivants pendant un certain temps dans la préparation (étude du mode de développement, etc.), on utilise des lames spéciales présentant une petite concavité ou *cellule*. Dans cette cellule on dépose une goutte de bouillon ensemencée avec le microbe et on obtient une véritable culture sous le microscope même.

§ 1er. — EXAMEN SUR LAME ORDINAIRE.

A. **Cultures en milieux liquides.** — 1° Préparer une lame et une lamelle absolument propres.

2° Dans le tube, ouvert avec les précautions ordinaires, prélever avec une pipette Pasteur quelques gouttes de la culture.

3° Au centre de la lamelle, saisie par un angle avec la pince de

Cornet, déposer une gouttelette du liquide aspiré dans la pipette.

4° Poser sur la lame la face de la lamelle où repose la goutte de culture en évitant l'introduction de bulles d'air qui gêneraient l'observation ; la goutte s'étend en couche mince.

5° Porter sur la platine du microscope ; examiner avec l'objectif 8 ou 9 et l'oculaire I ou II.

La pipette qui a servi à prélever la goutte de culture ne devra plus être employée ; il ne faut jamais déposer sur la table les pipettes qui ont été en contact avec une culture. Ces pipettes, réunies dans un vase métallique, sont stérilisées après chaque séance de manipulations, soit à l'autoclave, soit plus simplement par une ébullition de quelques minutes ; alors seulement elles peuvent être jetées.

B. **Cultures en milieux solides.** — 1° Sur le centre de la lamelle tenue avec la pince, déposer une gouttelette d'eau récemment filtrée au Chamberland.

2° Ouvrir comme d'ordinaire le tube de culture; prélever une trace de la culture avec l'öse de platine; refermer le tube.

3° Porter la trace de culture dans la goutte d'eau, sur la lamelle, et l'y délayer avec l'extrémité de l'öse. Flamber l'öse.

4° et 5° Comme plus haut.

Une faute souvent commise consiste à prélever une quantité exagérée de culture : on a alors trop de microbes dans le champ du microscope et l'observation est rendue très difficile; bien savoir que la préparation est d'autant plus démonstrative que les microbes y sont moins nombreux ; on juge alors mieux de leur forme, de leurs mouvements, etc.

§ 2. — EXAMEN EN CELLULE.

L'usage des cellules permet de conserver longtemps la vitalité des microbes soumis à l'examen et d'étudier leur développement.

Pour cultiver un microbe dans une cellule, il est indispensable de placer celle-ci à la température qui convient le mieux au développement du microbe (37° d'ordinaire), ce qu'on obtient en déposant la cellule dans une étuve d'où on la retire fréquemment pour la porter sous le microscope. Il est préférable de maintenir la cellule à la température optima sur la platine même du microscope en utilisant la *chambre chaude de Vignal* (fig. 94) ou la *platine chauffante de Ranvier*, véritables petites étuves dans lesquelles on observe la préparation par une ouverture circulaire découpée dans l'appareil.

La *platine chauffante de Pfeiffer* est plus simple et répond aux mêmes besoins; elle est constituée par une boite rectangulaire en verre dont la face supérieure, creusée d'une cellule, sert de porte-objet;

la boîte pleine d'eau est reliée à un thermostat par deux tubulures latérales; un thermomètre *t* indique la température (fig. 95 et 96);

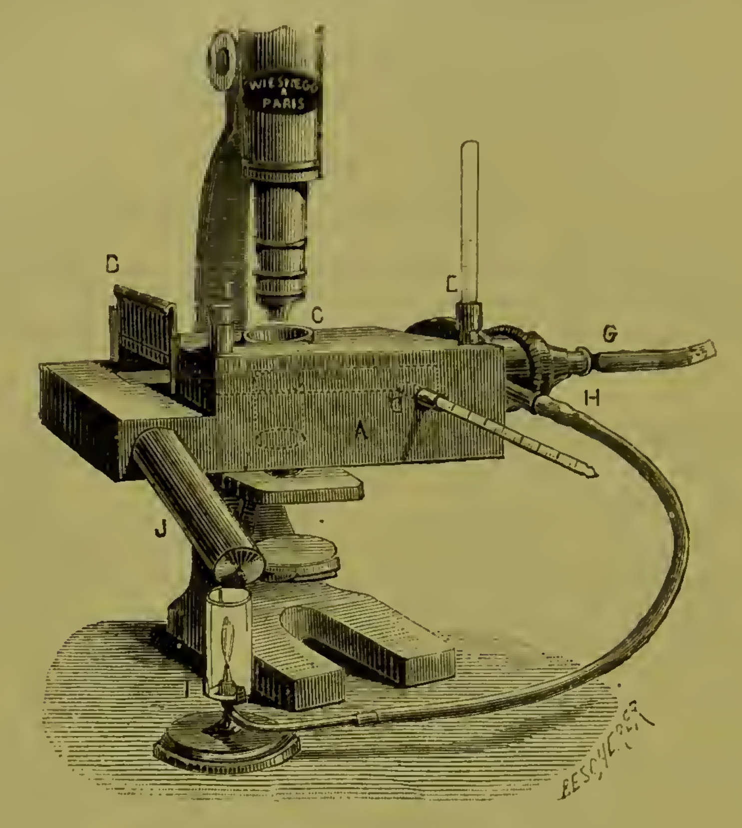


Fig. 94. — Chambre chaude de Vignal.

on dispose l'appareil sous le microscope comme une lame ordinaire.

Enfin on peut placer la partie inférieure du microscope dans une petite étuve (Zeiss, Plehn) constituée par une boîte entourant le statif, munie d'une fenêtre pour l'éclairage et de clapets latéraux permettant de manipuler la préparation. L'appareil, pourvu d'un régulateur, est chauffé par un brûleur à gaz. On ne peut dépasser une température de 45° sans endommager le microscope.



Fig. 95 — Platine chauffante de Pfeiffer.



Fig. 96.— Coupe suivant AB de la platine chauffante de Pfeiffer.

Les cellules utilisées sont de plusieurs modèles.

A. **Cellule de Koch.** — Procédé recommandé. — La cellule de Koch est une lame porte-objet de dimensions ordinaires, creusée en

son centre d'une dépression circulaire en cupule mesurant environ 15 millimètres de diamètre. On stérilise cette lame au moment de l'usage en la passant plusieurs fois rapidement dans la flamme du bec de Bunsen ou d'une lampe à alcool. La lamelle destinée à couvrir la cellule est également stérilisée par flambage au moment du besoin.

a. Pour étudier les microbes dans une culture antérieurement développée, on dépose au centre de la lamelle flambée et refroidie une gouttelette de cette culture ; on retourne alors la lamelle sur la cellule : la goutte de liquide adhérant à la face inférieure de la lamelle se trouve suspendue dans l'atmosphère de la cellule. On a soin de recouvrir avec un peu de vaseline les bords de la lamelle pour empêcher l'évaporation du liquide.



Fig. 97. — Étuve de Zeiss pour observations au microscope.

La goutte déposée au centre de la lamelle doit être assez petite pour ne pas toucher les bords de la cellule, sans quoi la capillarité ferait passer le liquide entre la lamelle et la lame et la goutte suspendue disparaîtrait.

Au cours de l'examen microscopique, il faut effectuer très prudemment le mouvement d'abaissement du tube du microscope : la lamelle ne portant que par ses bords, la moindre pression suffit à la briser. Se servir de l'objectif 8 ou 9 et de l'oculaire I ou II.

b. Le plus fréquemment on utilise la *goutte suspendue* pour observer le développement d'un microbe : il faut alors que la culture se fasse dans la cellule même. Pour cela on dépose sur la lamelle une

goutte de bouillon stérile ou d'humeur aqueuse de l'œil prélevée purement et on ensemence cette goutte avec le microbe à examiner.

Il est capital que l'ensemencement n'apporte à la goutte qu'un très petit nombre de germes; on peut prélever une trace de culture à l'extrémité d'un fil de platine droit et toucher très légèrement la goutte avec ce fil, mais il est préférable de recourir à la méthode des dilutions; on porte une öse de culture dans un tube de bouillon I, on agite; avec une ou deux gouttes du tube I, on ensemence un nouveau tube II, et c'est une goutte de bouillon prélevée dans ce tube qui sera déposée sur la lamelle.

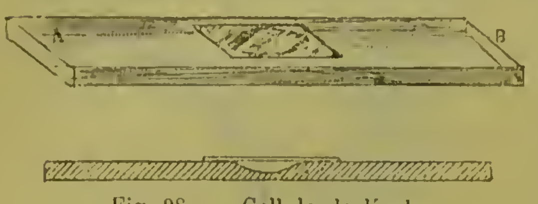


Fig. 98. — Cellule de Koch.

Si le tube II renfermait encore trop de microbes, on ensemencerait avec quelques gouttes de son contenu un tube III où l'on prélèverait la goutte à examiner.

Nous résumerons ainsi les temps successifs de l'opération :

1° Flamber la lame et la lamelle; laisser refroidir;

2° Porter au centre de la lamelle une goutte de bouillon stérile et ensemencer avec une trace de culture (ou mieux déposer sur la lamelle une goutte du milieu nutritif ensemencé par la méthode des dilutions);

3° Renverser la lamelle sur la cellule; luter les bords à la vaseline;

4° Examiner sur une platine chauffante ou porter à l'étuve et examiner fréquemment sur la platine ordinaire; se servir de l'objectif 8 ou 9 et de l'oculaire I ou II. S'assurer au commencement de l'épreuve que chaque champ du microscope contient au plus deux ou trois germes.

L'observation peut être poursuivie pendant un à trois jours; la quantité d'air contenue dans la cellule autour de la goutte suspendue suffit d'ordinaire à assurer le développement du microbe.

B. — **Cellule improvisée.** — Découper dans une feuille de carton un rectangle d'environ 3 centimètres de long sur 2 de large et 1,5 à 2 millimètres d'épaisseur; enlever au centre un petit carré de 15 millimètres de côté ; stériliser le morceau de carton par ébullition dans l'eau ou dans l'autoclave à 115°, le placer avec une pince flambée sur une lame passée à la flamme : on obtient ainsi une

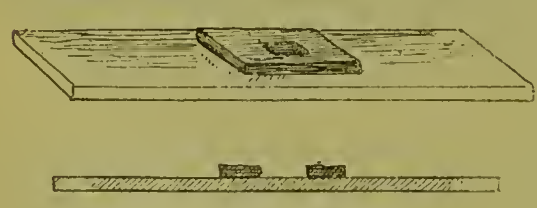


Fig. 99. — Cellule improvisée.

cellule sur laquelle on appliquera la lamelle portant la goutte pendante.

C. — **Cellule de Bœttcher.** — Cette cellule est constituée par une lame de verre sur laquelle est collé un petit anneau de verre de 15 à 20 millimètres de diamètre et de 5 millimètres de hauteur. Sur l'anneau on applique la lamelle portant la goutte suspendue. Placer un peu d'eau au fond de la cellule pour éviter l'évaporation de la goutte suspendue.

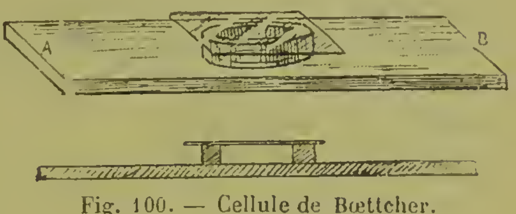


Fig. 100. — Cellule de Bœttcher.

D. — **Cellule de Ranvier.** — Dans les appareils précédents, la goutte suspendue présente une face inférieure sphérique; il en résulte une perturbation des rayons lumineux qui traversent le système, perturbation qui apporte une certaine gène à l'observation. Dans les recherches délicates, il est préférable que le liquide examiné présente deux faces parallèles; cette disposition est réalisée dans la cellule de Ranvier.



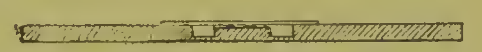


Fig. 101. — Cellule de Ranvier.

Elle est constituée par une lame de verre un peu épaisse creusée à son centre d'une rainure circulaire de 15 à 20 millimètres de diamètre, délimitant un plateau qu'elle entoure de tous côtés. La face supérieure de ce plateau est moins élevée que celle de la lame d'un dixième de millimètre. La goutte de liquide étant déposée sur le plateau, on couvre avec la lamelle; la goutte écrasée entre la face supérieure du plateau et la lamelle forme une couche d'un dixième de millimètre d'épaisseur, entourée de tous côtés par l'air retenu dans la rainure; on lute les bords de la lamelle et on opère pour le reste comme avec les appareils précédents.

Article II. — EXAMEN APRÈS COLORATION.

Les méthodes de coloration permettent d'étudier la morphologie des microbes, et fournissent des données importantes pour le diagnostic des espèces.

Les différentes espèces bactériennes, en effet, ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis des matières colorantes; les unes fixent facilement les couleurs et ne se laissent pas décolorer par

l'alcool ; d'autres au contraire abandonnent à l'alcool les matières colorantes qu'elles ont fixées ; d'autres encore se colorent difficilement, mais résistent à l'action des décolorants les plus énergiques.

Les bactéries sont des cellules végétales où le noyau occupe la plus grande place (Bütschli) ; elles fixent les colorants du noyau des cellules végétales, c'est-à-dire les *couleurs basiques d'aniline*.

Matières colorantes. — Ehrlich a divisé, au point de vue de leur action sur les cellules, les matières colorantes en deux groupes : les *couleurs basiques* et les *couleurs acides*.

Les *couleurs basiques* sont celles dont le principe colorant est une base combinée à un acide incolore. On les appelle encore *couleurs à élection*, car elles ont une électivité marquée pour les noyaux et particulièrement les noyaux des cellules végétales. Ces couleurs sont les véritables colorants des microbes ; les plus employées d'entre elles sont les suivantes :

Violets	Krystall violet. Violet de Lauth (thionine). Violet de gentiane. Violet de méthyle B (violet de Bâle). Violet de méthyle 6 B. Violet de Paris. Violet dahlia.	Bleus	Bleu de méthylène. Bleu Victoria. Bleu de quinoléine.
		Rouges	Fuchsine. Rubine. Safranine.
		Verts	Vert de méthyle. Vert malachite.
		Brun de Bismarck ; Vésuvine.	
		Noir Colin ; Induline.	

Dans les *couleurs acides*, au contraire, le principe colorant est un acide combiné à une base colorée ou non. Ce sont des *couleurs sans élection*, colorant les différents protoplasmas. La *fluorescéine* (éther phtalique de la résorcine), l'*éosine* (fluorescéine tétrabromée), l'*aurantia*, la *coccinine*, la *fuchsine acide*, le *picro-carmin* sont les plus employées de ces couleurs.

Remarque. — Les couleurs d'aniline possèdent une puissance de coloration intense ; elles tachent le linge, les doigts, etc. ; on doit les manier avec précaution ; éviter d'agiter les couleurs pulvérulentes (bleu de méthylène, violet de gentiane, etc.). Les mains tachées par les couleurs d'aniline seront décolorées assez facilement par l'alcoolé de savon.

Mordants. — En teinture, quand on veut fixer plus solidement une couleur sur un tissu, on emploie un agent intermédiaire, le mordant, qui, se combinant à la fois avec la matière colorante et le tissu, les réunit intimement l'un à l'autre.

Dans la coloration des microbes, on utilise également les mordants ; ils augmentent les affinités des matières colorantes pour les cellules et rendent la coloration plus rapide et plus durable ; les mordants ordinairement employés sont les suivants :

Acides. — Acide acétique, acide oxalique.
Phénol, *créosote*.
Tanin.
Iode, en solution iodo-iodurée.
Bichlorure de mercure.
Alcalins. — Potasse caustique, ammoniaque, borate de soude, carbonate d'ammoniaque, alcalis organiques (aniline, phénylamine, toluidine).
Mélange de deux matières colorantes dont l'une joue le rôle de mordant par rapport à l'autre.

Action de la chaleur. — On peut encore augmenter la rapidité et la solidité de la coloration en chauffant entre 60° et 100° la préparation immergée dans le bain colorant.

§ 1er. — SOLUTIONS COLORANTES.

Les solutions colorantes employées en bactériologie sont très nombreuses; chaque auteur ayant ses procédés préférés, il en résulte une complication et une multiplicité des formules qui embarrassent le débutant. La technique a tout à gagner à une simplification dans ces solutions; il suffit en réalité d'un petit nombre de formules pour satisfaire à tous les besoins. En s'attachant à connaître à fond l'emploi de quelques solutions, on évitera les échecs liés à l'usage d'une technique trop complexe et mal assurée.

Nous devons reproduire ici les différentes formules que l'on est exposé à rencontrer dans les travaux publiés au cours de ces dernières années, mais nous aurons soin d'indiquer spécialement les procédés que nous recommandons et dont l'emploi suffit à tous les cas. Dans ce chapitre nous laisserons de côté les couleurs acides sur lesquelles nous aurons plus tard à revenir.

A. — SOLUTIONS SIMPLES.

Ces solutions ont un emploi assez restreint; on leur préfère d'ordinaire les solutions mordancées.

I. — SOLUTIONS ALCOOLIQUES.

On les prépare en mêlant dans un flacon bouché à l'émeri :

Matière colorante........................	1 gramme.
Alcool absolu............................	10 centimètres cubes.

Agiter, laisser en contact. Filtrer avant l'emploi.

Ces solutions ne sont pas utilisées en nature : elles servent à la préparation des solutions hydro-alcooliques. Elle se conservent fort longtemps à l'abri de la lumière. On doit tenir prêtes d'avance les

solutions alcooliques de *fuchsine*, *krystall violet* ou *violet de gentiane* et *bleu de méthylène*.

II. — SOLUTIONS HYDRO-ALCOOLIQUES.

Se préparent en mélangeant :

Solution alcoolique filtrée..	1 à 5 centimètres cubes.
Eau distillée................	100 —

Ces solutions sont d'un usage peu fréquent ; elles se conservent mal ; il convient de les filtrer au moment de s'en servir.

Il est plus simple de les préparer au moment du besoin en versant plusieurs centimètres cubes d'eau dans un godet en porcelaine et en y ajoutant quelques gouttes de la solution alcoolique filtrée jusqu'à obtention d'une pellicule irisée, à reflets métalliques, couvrant la surface du liquide.

III. — SOLUTIONS AQUEUSES.

Dans un petit flacon, mêler :

Matière colorante............	0gr,25
Eau distillée................	25 centimètres cubes.

Agiter, laisser en contact, filtrer. La solution est saturée, il doit rester un excès de matière colorante au fond du flacon.

Ces solutions, se conservant mal, doivent être préparées au moment du besoin ; elles agissent lentement, mais donnent des colorations très nettes ; elles sont peu employées.

Les solutions aqueuses de *bleu de quinoléine*, *résuvine*, *vert de méthyle*, sont utilisées pour la coloration des microbes vivants.

B. — SOLUTIONS MORDANCÉES.

I. — SOLUTIONS PHÉNIQUÉES.

Ce sont les plus employées des solutions colorantes ; elles se conservent très longtemps sans perdre de leur pouvoir colorant.

Fuchsine phéniquée de Ziehl.

Fuchsine rubine..............	1 gramme.
Acide phénique neigeux......	5 grammes.
Alcool absolu................	10 centimètres cubes.
Eau distillée................	100 —

Triturer dans un petit mortier de verre la fuchsine et l'alcool ; ajouter l'acide phénique, mélanger ; ajouter par petites portions, en

continuant de remuer, les deux tiers de l'eau ; verser dans un flacon; rincer le mortier avec le reste de l'eau ; réunir les liquides. Laisser en contact vingt-quatre heures; filtrer dans un flacon propre, bouché à l'émeri.

On utilise souvent une liqueur diluée, préparée comme il suit :

Fuchsine de Ziehl diluée.

Mélanger :

Fuchsine de Ziehl	1 centimètre cube.
Eau distillée	6 à 10 centimètres cubes.

Préparer au moment du besoin. Filtrer.

Krystall violet phéniqué (Roux).

Krystall violet	1 gramme.
Acide phénique neigeux	2 grammes.
Alcool absolu	10 centimètres cubes.
Eau distillée	100 —

Préparer comme la fuchsine de Ziehl ; s'emploie en nature ; sert principalement à pratiquer la méthode de coloration de Gram.

Le krystall violet étant un composé cristallisé bien défini, ses préparations sont supérieures à celles du violet de gentiane, produit amorphe, de composition variable.

Violet de gentiane phéniqué (Nicolle).

Se prépare comme la solution précédente, en remplaçant le krystall violet par le violet de gentiane.

Peut sans inconvénient être supprimé de la technique.

Thionine phéniquée (Nicolle).

Thionine	0gr,50 à 1 gramme.
Acide phénique neigeux	2 grammes.
Alcool absolu	10 centimètres cubes.
Eau distillée	100 —

Préparer comme la solution de Ziehl.

Solution recommandée pour la coloration des coupes et frottis ; elle colore un peu plus lentement, mais donne des préparations plus nettes que le krystall violet et le violet de gentiane. N'utiliser qu'une thionine de bonne qualité, sous peine de s'exposer à des mécomptes.

Bleu de méthylène phéniqué (Kühne).

Bleu de méthylène	1gr,5 à 2 grammes.
Acide phénique neigeux	2 —
Alcool absolu	10 centimètres cubes.
Eau distillée	100 —

Préparer comme ci-dessus.

II. — SOLUTIONS ANILINÉES.

Ces solutions se conservent mal et doivent être préparées au moment du besoin ; elles ne présentent aucun avantage sur les solutions phéniquées et sont de moins en moins utilisées.

Pour les obtenir, préparer d'avance :

Eau d'aniline.

Huile d'aniline..................	5	centimètres cubes.
Eau distillée....................	100	—

Mélanger dans un flacon en verre jaune ; agiter fortement, laisser en contact. Au moment du besoin, filtrer sur un papier préalablement mouillé. Veiller à ce qu'il ne passe pas de fines gouttelettes d'huile qui fausseraient les résultats de la coloration ; si cet accident se produisait, filtrer de nouveau la solution.

Violet aniliné d'Ehrlich.

Filtrer au-dessus d'un godet en porcelaine environ 10 centimètres cubes d'eau d'aniline. Au filtrat ajouter quelques gouttes de solution alcoolique filtrée de violet de gentiane jusqu'à obtention d'une pellicule irisée. Employer immédiatement. La solution doit être renouvelée chaque jour.

On préparerait de même la fuchsine, le krystall violet, le bleu de méthylène anilinés.

III. — SOLUTIONS ALCALINES.

Ces solutions ont été très employées en Allemagne ; aujourd'hui on n'utilise guère que le *bleu alcalin de Löffler*. Le *bleu de Borrel* (Voy. *Hématozoaires*) est également une solution alcaline.

Bleu alcalin de Löffler.

Solution alcoolique de bleu de méthylène......	30	centimètres cubes.
Solution de potasse caustique à 1 p. 10 000....	100	—

Mêler dans un flacon ; filtrer au moment du besoin ; s'altère rapidement par suite de la combinaison de KOH avec CO^2 de l'air.

Bleu alcalin de Kühne.

Solution alcoolique de bleu de méthylène......	30	centimètres cubes.
Solution de carbonate d'ammoniaque à 1 p. 100.	100	—

Mêler ; filtrer au moment du besoin. Se conserve mieux que la solution précédente.

IV. — SOLUTIONS BICHLORURÉES.

Violet de Nastikow.

Solution aqueuse de bichlorure de mercure à 1 p. 2000....	10 centimètres cubes.
Solution alcoolique de violet de gentiane....................	1 centimètre cube.

Mêler. Filtrer. Se conserve mal.

V. — COULEURS COMPOSÉES.

Bleu de Roux.

Solution A.		Solution B.	
Violet dahlia......	1 gramme.	Vert de méthyle...	2 grammes.
Alcool absolu......	10 grammes.	Alcool absolu.....	20 —
Eau distillée.......	Q. S. p. 100 gr.	Eau distillée......	Q. S. pour 200 gr.

1° Préparer séparément chacune de ces deux solutions : triturer dans un mortier la matière colorante et l'alcool, ajouter l'eau peu à peu, laisser vingt-quatre heures en contact dans un flacon.

2° Mélanger les deux solutions ; filtrer ; conserver en flacon bien bouché.

Remarque. — Les solutions colorantes que nous venons d'étudier sont les plus généralement employées ; quelques autres, d'un usage restreint, trouveront leur place dans les chapitres de technique spéciale.

On tiendra préparées d'avance les solutions suivantes, d'usage constant :

Fuchsine de Ziehl.	Bleu phéniqué.
Krystall violet phéniqué.	Bleu alcalin.
Thionine phéniquée.	Bleu composé de Roux.

§ 2. — COLORATIONS SIMPLES.

Pour la pratique des colorations, il faut avoir à portée de la main :

a. Plusieurs petits entonnoirs munis de filtres plissés ; les matières colorantes seront filtrées avant chaque utilisation et on en laissera tomber directement une goutte de l'entonnoir sur la préparation.

b. Une pissette (fig. 102) permettant d'obtenir l'écoulement du liquide par simple inclinaison du flacon et contenant de l'eau récemment filtrée au Chamberland.

c. Un grand cristallisoir en verre pour recueillir les liquides de lavage.

d. Des lames, lamelles, une pince de Cornet ou de Debrandt, des öse, une compresse fine, de petits carrés de papier filtre, des pipettes Pasteur.



Fig. 102. — Pissette.

e. Un bec de Bunsen à veilleuse.

A. — COLORATION DES MICROBES VIVANTS.

La coloration des microbes vivants permet de les rendre plus accessibles à l'observation microscopique, tout en respectant leur motilité.

Cette coloration s'obtient avec les solutions aqueuses de couleurs dépourvues d'action toxique sur les microbes : vésuvine (Metchnikoff), vert de méthyle (Babès), bleu de quinoléine, fuchsine, etc.

Opération. — Opérer comme pour l'examen sans coloration ; mais, après avoir placé la lamelle sur la lame, disposer sur un des bords de la lamelle une goutte de la solution aqueuse de matière colorante ; la solution pénètre par capillarité et colore les microbes.

On peut encore, après avoir déposé la goutte de culture sur la lamelle, y ajouter avec une pipette fine une gouttelette de la solution colorante, puis mélanger avec l'extrémité de la pipette : renverser sur la lame et examiner.

B. — COLORATION DES PRÉPARATIONS SÈCHES.

C'est le procédé qui permet le mieux de juger des caractères morphologiques des microbes ; de plus il donne des préparations durables pouvant être conservées fort longtemps.

Opération. — 1° Déposer une goutte de la culture en bouillon sur la lamelle tenue avec la pince de Cornet. Étaler avec l'extrémité de la pipette, *ou* :

Déposer une goutte d'eau filtrée sur la lamelle et y délayer une trace de la culture sur milieu solide. Étaler avec l'öse.

2° Dessécher à une douce chaleur, soit en maintenant la lamelle à une certaine hauteur au-dessus de la veilleuse du bec de Bunsen, soit en la plaçant sur une *platine de Koch* (fig. 103) chauffée à 45°-50°.

Avoir soin pendant la dessiccation d'étaler constamment le liquide sur la lamelle pour éviter la production de cercles concentriques.

3° Pour que les microbes ne se détachent pas de la lamelle pendant les lavages, *fixer* : *a.* en passant rapidement, à deux ou trois reprises, dans la flamme chauffante du bec de Bunsen, la lamelle

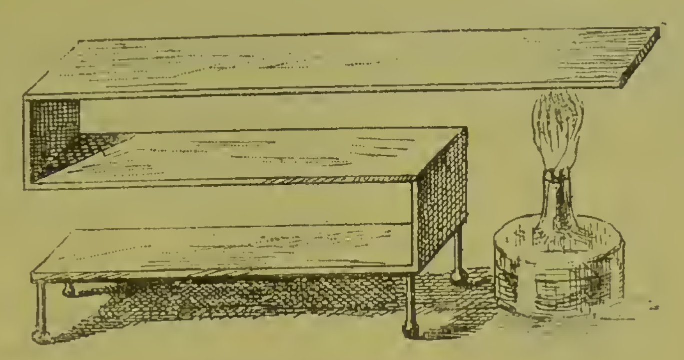


Fig. 103. — Platine de Koch.

dont la face enduite est tournée en haut ; ce procédé a l'inconvénient de déformer, de ratatiner les bactéries ; — *b.* en versant sur la face enduite de la lamelle deux ou trois gouttes d'alcool-éther ; laisser évaporer. Ce procédé ne déforme pas les microbes.

Alcool-éther.

Alcool absolu..........	50 centimètres cubes.	
Éther rectifié............	50	—

4° Faire tomber du filtre sur la préparation deux ou trois gouttes de solution colorante (fuchsine de Ziehl diluée, thionine phéniquée, bleu alcalin, etc.); avoir soin que le liquide ne passe pas à la face inférieure de la lamelle. Laisser en contact trente à soixante secondes.

5° Laver en faisant tomber avec la pissette un filet d'eau sur un des coins de la lamelle ; ne jamais verser l'eau directement sur le centre de la préparation pour ne pas entraîner les microbes.

6° Examiner (de préférence avec l'objectif 1/12 et l'oculaire I ou II) :

a. Extemporanément, dans l'eau, en portant immédiatement la lamelle sur une lame. Essuyer soigneusement la face supérieure de la lamelle avec un linge fin avant d'y placer la goutte d'huile de cèdre nécessaire pour l'emploi de l'objectif ;

b. Après dessiccation et montage au baume du Canada ; pour cela, sécher la lamelle à l'air ou à une douce chaleur, déposer alors sur la face enduite une goutte de baume prise au bout d'une baguette de verre, appliquer sur une lame et presser légèrement pour étaler le baume.

En résumé :

Étaler sur la lamelle la goutte de culture, *sécher*, *fixer*, *colorer*, *laver à l'eau*, *sécher*, *monter au baume*, *examiner*.

Remarques. — *a.* Il est important de se rappeler au cours des manipulations quelle est la face de la lamelle qui est enduite de culture : quand on a perdu cette face, il est quelquefois malaisé de la retrouver ; on y arrive en frottant légèrement le voisinage des bords de la lamelle avec une pointe d'aiguille : on produit ainsi du côté de la face enduite des éraillures faciles à reconnaître. On évite ces désagréments en tenant la lamelle avec la pince de Cornet dont l'un des mors est muni d'un petit bouton frappé dans le métal ; le bouton devra toujours être tenu en haut et correspondre à la face de la lamelle recouverte de microbes.

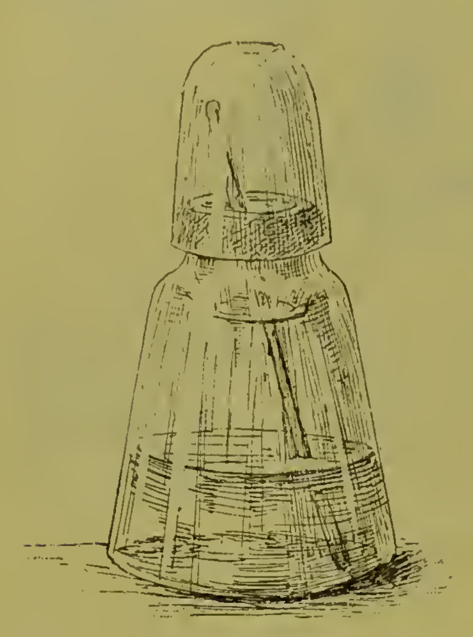


Fig. 104. — Flacon à baume du Canada.

b. Ne déposer sur la lamelle qu'une très petite quantité de culture : on juge mieux de la forme des microbes quand il n'y a qu'un petit nombre d'individus par champ de microscope.

c. Employer le baume du Canada dissous dans le xylol ; la solution devra avoir une consistance sirupeuse telle qu'elle ne file pas quand on en prélève une goutte avec un agitateur : on conserve le baume dans un flacon fermé par un bouchon-cloche en verre et muni d'un rebord qui permet d'égoutter l'excès de baume emporté par l'agitateur (fig. 104).

d. L'alcool-éther, l'alcool et en général tous les réactifs volatils seront conservés de préférence dans des flacons compte-gouttes bouchant à l'émeri (nombreux modèles dans le commerce) ; donner la préférence aux flacons de forme basse, en verre épais et de contenance de 60 à 100 centimètres cubes.

§ 3. — MÉTHODE DE COLORATION DE GRAM.

Gram a imaginé une méthode de coloration qui permet de classer les bactéries en deux groupes.

Quand on colore certaines bactéries par une couleur basique en solution anilinée ou phéniquée, et que l'on fait agir ensuite sur la préparation un mordant spécial à base d'iode, ces bactéries ne se décolorent plus par l'action de dissolvants tels que l'alcool absolu : c'est le cas de la *Bactéridie charbonneuse*, par exemple.

Au contraire, d'autres bactéries, traitées de la même façon, se

laissent décolorer facilement par l'alcool absolu : c'est ce qui se produit pour le *Bacille typhique*, par exemple.

On caractérise les bactéries suivant la façon dont elles se comportent vis-à-vis de cette réaction : on dit qu'elles *prennent le Gram* quand elles restent colorées, et au contraire, qu'elles ne *prennent pas le Gram* quand elles se décolorent. La Bactéridie charbonneuse prend le Gram, le Bacille d'Eberth ne prend pas le Gram.

Le mordant utilisé a la composition suivante :

Liquide de Gram.

Iode	1 gramme.
Iodure de potassium	2 grammes.
Eau distillée	300 centimètres cubes.

Dans le procédé type on emploie comme décolorant l'*alcool absolu*, auquel on substitue parfois l'*huile d'aniline pure* (Weigert) ou l'*alcool acétone* (Nicolle).

Alcool acétone.

Alcool absolu	2 parties.
Acétone	1 partie.

La méthode de Gram a subi de nombreuses modifications et est utilisée pour pratiquer des doubles colorations dans les frottis, les coupes, etc. ; nous étudierons ces applications dans un chapitre spécial ; pour le moment nous nous en tiendrons à l'exposé de la méthode classique employée comme procédé de diagnostic.

Opération. — 1° Préparer une lamelle sèche (Voy. p. 142).

2° Colorer pendant trente à cinquante secondes avec la solution colorante ; nous recommandons le krystall violet phéniqué.

3° Rejeter l'excès de matière colorante (ne pas laver), puis déposer sur la préparation deux ou trois grosses gouttes du liquide de Gram ; laisser en contact vingt à trente secondes. La préparation prend une teinte brune.

4° Laver à l'eau, sécher.

5° Verser goutte à goutte de l'alcool absolu sur la lamelle pendant vingt à soixante secondes suivant les cas (intensité, durée d'action de la matière colorante, nombre de microbes, etc.).

6° Laver rapidement à l'eau.

7° Examiner la préparation dans l'eau. Si les microbes prennent le Gram ils sont colorés en violet intense ; dans le cas contraire ils sont décolorés ; parfois certains individus sont décolorés, les autres présentant encore une teinte violette, il suffira alors d'un nouveau lavage de quelques secondes à l'alcool pour terminer la réaction.

Pour conserver la préparation, sécher et monter dans le baume.

En résumé :

Préparer une lamelle sèche, colorer, traiter par la solution iodurée, laver, sécher, traiter par l'alcool, laver, examiner.

Remarques. — *a*. Le temps 5 (décoloration) est d'une exécution délicate, sa durée varie selon la matière colorante employée, sa durée d'action, etc. : on n'arrivera à une réussite complète qu'après quelques tâtonnements ; l'habitude et un certain tour de main constituent mieux que toutes les règles l'élément capital de succès. Savoir que, si une décoloration insuffisante peut induire en erreur, on parvient à décolorer les bactéries les plus résistantes en prolongeant outre mesure le contact de l'alcool.

b. Les préparations traitées par la méthode de Gram se conservent moins bien que celles qui sont colorées par les procédés ordinaires : elles se décolorent à la longue.

§ 4. — MÉTHODE DE CLAUDIUS.

Claudius a proposé une méthode de coloration qui présente tous les avantages du procédé de Gram, mais est d'une application plus aisée et donne des résultats plus constants que ce dernier. C'est ainsi, par exemple, que le *Vibrion septique* et le *Bacille du charbon symptomatique*, qui prennent assez difficilement le Gram, se colorent aisément par la méthode de Claudius.

Nous avons répété les recherches de Claudius et nos résultats confirment pleinement ceux qu'a obtenus ce savant. Sa méthode présente, en outre, un grand avantage pour les élèves : les débutants ne savent jamais à quel moment ils doivent arrêter la décoloration, dans la méthode de Gram : tantôt ils laissent agir l'alcool trop longtemps, tantôt, au contraire, ils enlèvent trop tôt l'agent décolorant et, dans les deux cas, les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants ; cet inconvénient ne se présente pas avec la méthode de Claudius.

La méthode de Claudius nécessite l'emploi : 1° d'une solution aqueuse à 1 p. 100 de violet de méthyle 6 B (ou de la solution de violet de gentiane phéniquée) ; 2° d'une solution d'acide picrique :

Solution saturée d'acide picrique..............	1 volume.
Eau distillée..................................	1 —

Opération. — 1° Préparer une lamelle sèche, comme d'ordinaire.

2° Colorer pendant une minute avec la solution de violet.

3° Laver à l'eau, égoutter l'excès d'eau.

4° Faire agir pendant une minute la solution picriquée ; puis l'enlever avec un morceau de papier filtre.

5° Décolorer avec du chloroforme ou de l'essence de girofle jusqu'à ce que le réactif ne se teinte plus en bleu.

6° Examiner dans l'essence de girofle ou monter dans le baume.

CHAPITRE IX

COLORATION DES SPORES, DES CAPSULES ET DES CILS

Article I. — SPORES.

Certaines bactéries, à un moment de leur existence, montrent à l'intérieur de leur protoplasma un petit point brillant, réfringent, réfractaire aux couleurs d'aniline, c'est la *spore* ou plus exactement l'*endospore* (découverte par Pasteur).

Les spores sont mises en liberté par la mort et la destruction du bacille qui leur a donné naissance. Elles sont entourées d'une membrane très résistante qui les soustrait à l'action de la plupart des agents de destruction et empêche leur pénétration par les solutions colorantes ordinairement employées.

La formation de l'endospore n'a pas lieu chez un certain nombre de bactéries et en particulier chez les coccus; la forme durable de ces microbes est l'*arthrospore* : une cellule augmente sa membrane d'enveloppe, la rend plus résistante. Les arthrospores présentent les mêmes réactions colorantes que les microbes correspondants.

Nous n'avons donc à insister que sur la coloration des endospores. La *Bactéridie charbonneuse*, le *Bacillus megaterium*, le *Vibrion septique*, le *Bacille du tétanos*, le *Bacillus subtilis*, etc., sont les microorganismes chez lesquels on étudie d'ordinaire les spores.

§ 1er. — EXAMEN SANS COLORATION.

La spore se présente comme une petite granulation réfringente, sphérique ou ovoïde, située dans l'intérieur du protoplasma cellulaire et entourée d'un anneau de substance claire. La spore est toujours plus petite que la cellule mère; une cellule mère ne donne jamais qu'une seule spore, qui, après formation, est mise en liberté par la disparition du protoplasma cellulaire autour d'elle. La germi-

nation de la spore donne naissance à une nouvelle bactérie.

Tous ces phénomènes s'observent très facilement chez la Bactéridie charbonneuse dans une culture en goutte suspendue faite sous le microscope (Voy. p. 131); quand on veut simplement rechercher l'existence des spores chez une bactérie, on fait une préparation sur lame ordinaire, comme nous l'avons indiqué page 130.

§ 2. — COLORATION DES SPORES.

Après l'action des solutions colorantes ordinaires, les spores restent incolores, formant des taches claires dans les bacilles colorés; des procédés spéciaux permettent de vaincre leur résistance.

A. — COLORATION SIMPLE.

Cette méthode, qui convient aux *Clostridium* et aux *Bacilles en épingle*, colore uniformément les bacilles et les spores.

a. **Procédé recommandé.** — 1° Préparer une lamelle avec la culture à examiner. Sécher.

2° Passer dix fois la lamelle, la face enduite de culture tournée en haut, dans la flamme chauffante d'un bec de Bunsen, assez rapidement pour ne pas charbonner la préparation.

3° Colorer avec le violet phéniqué pendant quinze à trente minutes.

4° Laver, sécher, monter dans le baume, examiner. Les bactéries et les spores sont colorées en violet.

b. **Procédé à l'acide chromique.** — 1° Préparer une lamelle; sécher.

2° Déposer sur la lamelle et y laisser pendant quatre à cinq minutes une grosse goutte d'une solution d'acide chromique à 1 p. 20.

3° Laver à l'eau.

4° Colorer au violet phéniqué pendant quinze à trente minutes.

5° Laver, monter, examiner.

B. — DOUBLE COLORATION.

Elle a pour but de colorer différemment, de *différencier* les bacilles et les spores.

Principe. — Les spores se colorent difficilement, mais une fois pénétrées retiennent avec énergie les matières colorantes et résistent à l'action des substances qui décolorent les bacilles.

a. **Procédé recommandé.** — 1° Préparer une lamelle; sécher; fixer en passant rapidement deux à trois fois dans la flamme.

2° Déposer sur la lamelle une grosse goutte de fuchsine de Ziehl.

porter au-dessus d'une petite flamme; chauffer jusqu'à apparition de vapeurs; approcher et éloigner de la flamme de manière à prolonger pendant quatre à cinq minutes l'action du liquide chaud. Les spores et les bactéries se colorent en rouge intense.

3° Laver à l'eau.

4° Faire agir sur la lamelle pendant quelques secondes une solution au quart d'acide nitrique :

Acide nitrique pur........................	1 partie.
Eau distillée..............................	3 parties.

Les bacilles se décolorent; les spores restent colorées.

5° Laver à grande eau.

6° Déposer sur la préparation une goutte de solution aqueuse de bleu de méthylène; laisser en contact vingt à trente secondes. Les bacilles précédemment décolorés fixent le bleu.

7° Laver, sécher, monter au baume. Les bacilles sont colorés en bleu, les spores en rouge.

Remarque. — Cette méthode donne d'excellents résultats avec le *B. megaterium*; elle réussit moins bien avec la Bactéridie charbonneuse pour laquelle il est préférable d'utiliser comme décolorant (temps 4) l'alcool absolu. — La décoloration, d'ailleurs, constitue le point délicat de cette manipulation; après quelques tâtonnements on arrive à déterminer le temps nécessaire pour obtenir la décoloration des différents bacilles tout en conservant la coloration de leurs spores.

b. **Procédé de Mœller.** — 1° Préparer une lamelle. Sécher. Fixer pendant deux minutes à l'alcool absolu ; remplacer l'alcool par du chloroforme (deux minutes). Ne pas laver.

2° Déposer sur la lamelle quelques gouttes d'une solution d'acide chromique à 1 p. 20 (quatre à cinq minutes).

3° Colorer avec la fuchsine de Ziehl, à chaud, comme dans le procédé ci-dessus; laver à l'eau.

4° Décolorer pendant quelques secondes avec une solution d'acide sulfurique à 5 p. 100; achever la décoloration avec l'alcool absolu.

5°-6°-7° Laver, colorer au bleu, monter, comme ci-dessus.

Article II. — CAPSULES.

Certains microbes sont entourés d'une zone hyaline brillante, ou *capsule*, que l'on peut mettre en évidence par des artifices de coloration; le microbe est alors fortement coloré et autour de lui apparaît la capsule pâle avec un bord faiblement teinté.

1° Préparer une lamelle, sécher, fixer.

2° Colorer avec une goutte du mélange suivant :

Violet acétisé.

Acide acétique	1 gramme.
Solution alcoolique { de violet de gentiane / ou de krystall violet. }	5 centimètres cubes.
Eau distillée	100 —

Laisser agir trente à soixante secondes.

3° Laver, sécher, monter au baume.

Ce procédé suffit dans la majorité des cas; la coloration des microbes encapsulés, dans les coupes, exige des procédés spéciaux que nous étudierons plus loin (Voy. 2e Partie, ch. xv).

La simple coloration par la fuchsine de Ziehl diluée donne aussi d'assez bons résultats.

Article III. — CILS.

Les *cils vibratiles* ou *flagella*, organes de mouvement des microbes, ne sont visibles à l'état frais et sans coloration que chez les espèces de grande taille telles que les sulfobactéries (*Bacterium photometricum*, *Beggiatoa roseopersinica*, etc.); chez les autres bactéries mobiles, leur étude nécessite des procédés complexes de coloration.

§ 1er. — COLORATION DES CILS DES BACTÉRIES VIVANTES.

PROCÉDÉ DE STRAUS.

1° Déposer sur un porte-objet une goutte de culture en bouillon.

2° Y ajouter une goutte de solution de Ziehl étendue de trois à quatre parties d'eau; mélanger la culture avec la goutte colorante.

3° Couvrir avec une lamelle et examiner immédiatement avec l'objectif à immersion.

Les bacilles sont colorés en rouge intense et les cils teintés en rose pâle avec des grains rouges plus foncés disposés en série le long des flagella; les cils apparaissent surtout sur les bacilles bien vivants et très mobiles.

Remarque. — Ce procédé, très expéditif, ne réussit qu'avec certains microbes, principalement le *Vibrion du choléra*, le *V. de Finkler-Prior*, le *V. Metchnikowi*; il échoue à colorer les cils d'un grand nombre de bactéries (*B. typhique*, *B. coli commune*, *B. subtilis*, par exemple).

§ 2. — COLORATION DES CILS DES BACTÉRIES DESSÉCHÉES.

RÈGLES GÉNÉRALES.

1° Prendre une petite quantité de culture récente sur gélose et la délayer dans un verre de montre rempli d'eau ordinaire (préférable

à l'eau distillée) de manière à obtenir une suspension à peine trouble et absolument homogène.

2° Déposer avec une pipette une goutte de cette émulsion sur une lamelle scrupuleusement propre, flambée et tenue avec une pince de Cornet. Si la lamelle n'est pas parfaitement nettoyée, le liquide ne s'y répand pas également.

3° En inclinant la lamelle dans tous les sens, répartir le liquide à sa surface, puis aspirer avec la pipette l'excès de liquide qui se rassemble à l'angle inférieur de la lamelle.

4° Laisser sécher à la température ordinaire, à l'abri des poussières. Ne pas fixer.

La lamelle est alors prête à subir l'action des liquides colorants employés suivant l'une des méthodes que nous allons exposer.

En observant ces règles on obtient une dilution telle que chaque champ du microscope ne contient qu'un petit nombre de bactéries, condition indispensable pour une bonne observation ; de plus on élimine autant qu'il est possible les matières muqueuses qui agglomèrent les microbes dans les cultures et forment sur la lamelle des précipités abondants obscurcissant la préparation.

A. — PROCÉDÉ DE LÖFFLER.

La mise en œuvre de ce procédé exige les réactifs suivants :

Encre de fuchsine.

Solution aqueuse de tanin à 20 p. 80	10 centimètres cubes.
Solution aq. saturée à froid de sulfate ferreux	5 —
Solution alcoolique saturée de fuchsine	1 centimètre cube.

Mêler. Ne pas filtrer. Cette solution doit être employée fraîche.

Solution alcaline.

Soude à l'alcool	1 gramme.
Eau distillée	100 centimètres cubes.

Solution acide.

Acide sulfurique pur	1 gramme.
Eau distillée	100 centimètres cubes.

Solution colorante.

Eau d'aniline	100 centimètres cubes.
Solution de soude à 1 p. 100	1 centimètre cube.
Violet de gentiane ou fuchsine	4 à 5 grammes.

Agiter ; laisser en contact quelques heures dans un flacon ; filtrer.

Opération. — 1° *Mordançage.* — Déposer sur la lamelle préparée comme ci-dessus une grosse goutte d'encre de fuchsine additionnée,

suivant le microbe dont on veut colorer les cils, d'un certain nombre de gouttes de la solution acide ou de la solution alcaline. Chauffer sur la veilleuse du bec Bunsen jusqu'à dégagement de vapeurs sans atteindre l'ébullition et pendant trente à cinquante secondes.

La quantité des solutions alcaline ou acide à ajouter à 16 centimètres cubes d'encre de fuchsine a été déterminée par tâtonnements. Voici les chiffres qui se rapportent aux principales bactéries ciliées :

Mordant sans addition aucune	Spirillum concentricum.
+ 1/2 à 1 goutte solution acide	Vibrion du choléra.
+ VI gouttes	Bacille pyocyanique.
+ XVIII à XX gouttes sol. alcaline.	Micrococcus agilis.
+ XX gouttes	Charbon symptomatique.
+ XX à XXX gouttes	Bacille typhique.
+ XXVIII à XXX gouttes	Bacillus subtilis.
+ XXVI à XXVIII gouttes	Vibrion septique.
+ { de XX gouttes solution acide / à XV gouttes solution alcaline }.	Bacille du lait bleu.

Ce temps de la préparation est très délicat et expose à des insuccès.

2° Laver à l'eau, puis à l'alcool absolu.

3° *Coloration.* — Déposer sur la lamelle une goutte de la solution colorante ; chauffer jusqu'à dégagement de légères vapeurs pendant environ une minute.

4° Laver à grande eau, examiner la préparation dans l'eau ; si elle est bonne, sécher et monter dans le baume.

Le procédé de Löffler, longtemps classique, exige de longs tâtonnements et donne des résultats médiocres. Les préparations sont souvent obscurcies par un précipité abondant qui empêche de distinguer les cils.

B. — PROCÉDÉ DE REMY ET SUGG.

Ce procédé, modification de celui de Löffler, a pour but d'éviter les précipités granuleux que nous avons signalés. L'encre de fuchsine est employée à froid, son action est suivie de celle d'une solution iodurée et le bain colorant suivant est substitué à celui de Löffler :

Solution colorante.

Eau phénylaminée (1)	20 centimètres cubes.
Solution alcoolique de violet de gentiane	1 goutte.
Eau distillée	5 centimètres cubes.

(1) Se prépare comme l'eau d'aniline (Voy. p. 140).

Déposer la goutte de solution alcoolique dans l'eau distillée, puis mèler à l'eau phénylaminée.

Opération. — 1° *Mordançage.* — Opérer comme dans le procédé de Löffler, mais ne pas chauffer et maintenir le contact du mordant et de la lamelle pendant quinze à trente minutes.

2° Rejeter le mordant et le remplacer immédiatement par une goutte de liquide de Gram.

3° Laver à l'eau, puis à l'alcool absolu.

4° Déposer la lamelle dans un verre de montre rempli de la solution colorante; laisser en contact une demi-heure, de préférence à l'étuve à 37 degrés.

5° Laver à l'eau; examiner dans l'eau; sécher; monter dans le baume.

C. — PROCÉDÉ DE NICOLLE ET MORAX.

Procédé recommandé.

Ce procédé, simplification de celui de Löffler, supprime l'emploi si délicat des solutions acide et alcaline et permet d'obtenir des préparations satisfaisantes des cils de tous les microbes mobiles. Au colorant de Löffler on substitue la fuchsine de Zielh.

1° *Mordançage.* — Déposer sur la lamelle une grosse goutte d'encre de fuchsine (sans addition d'aucune sorte); chauffer une dizaine de secondes sur la flamme de la veilleuse.

Dès que des vapeurs apparaissent, jeter le mordant, incliner la lamelle et faire tomber sur l'angle supérieur le jet d'une pissette pour bien laver la préparation sans entraîner la couche de microbes.

Répéter deux à trois fois ces opérations (mordançage et lavage).

Après chaque lavage, essuyer la face inférieure de la lamelle et les mors de la pince, sans quoi, lors du mordançage suivant, l'encre de fuchsine s'écoulerait sous la lamelle et le long de la pince.

2° *Coloration.* — Mettre une goutte de fuchsine de Ziehl sur la lamelle; chauffer une ou deux fois jusqu'à apparition de vapeurs pendant quinze secondes.

3° Laver à l'eau, examiner dans ce liquide; si la préparation est réussie, sécher et monter dans le baume.

D. — PROCÉDÉ DE VAN ERMENGEN.

Procédé recommandé.

Ce procédé, qui donne de très belles préparations, est basé sur la réduction du nitrate d'argent au niveau des cils des bactéries. Nous l'employons de préférence à tous les autres.

1° Placer la lamelle pendant une minute à 50° ou trente minutes à froid dans le bain suivant, préparé au moment du besoin :

Solution aqueuse d'acide osmique à 2 p. 100....	8 centimètres cubes.
Solution aqueuse de tanin à 10 p. 100..........	16 —
Acide acétique cristallisable.....................	1 goutte.

2° Laver à l'eau, puis à l'alcool absolu.

3° Placer la lamelle pendant une à deux minutes dans le bain d'argent :

Nitrate d'argent cristallisé....................	1 gramme.
Eau distillée..................................	200 centimètres cubes.

4° Porter la lamelle pendant une minute, sans la laver, dans le bain réducteur :

Acide gallique................................	5 grammes.
Tanin	3 —
Acétate de soude fondu........................	10 —
Eau distillée.................................	350 centimètres cubes.

5° Sans laver, reporter la lamelle dans le bain d'argent et l'y agiter jusqu'à ce que celui-ci prenne une teinte noire.

6° Laver, sécher, monter dans le baume.

E. — PROCÉDÉ DE BOWHILL.

1° *Mordançage.* — Placer la lamelle pendant dix minutes à 40°-50°, dans le bain mordant préparé au moment du besoin en mélangeant parties égales des solutions suivantes :

Solution A.		*Solution B.*	
Orcéine	1 gramme.	Tanin	8 grammes.
Alcool absolu...	50 centimètres cubes.	Eau distillée....	40 centimètres cubes.
Eau distillée....	40 —	Dissoudre à chaud.	

Filtrer le bain avant l'emploi. Pour les cils du *Vibrion du choléra*, ajouter 1 centimètre cube de solution saturée d'alun pour 10 centimètres cubes de mordant.

2° Laver à l'eau. Sécher.

3° *Coloration.* — Déposer sur la lamelle une goutte de violet de gentiane aniliné; chauffer jusqu'à apparition de vapeurs pendant quinze à trente secondes.

4° Laver, sécher, monter dans le baume.

F. — PROCÉDÉ DE TRENKMANN.

Mordançage. — 1° Déposer la lamelle et la laisser six à huit heures dans le bain suivant :

Tanin....	2 grammes.
Eau distillée....	100 centimètres cubes.
Acide chlorhydrique pur....	IV gouttes.

2° Laver à l'eau, puis plonger la lamelle dans un verre de montre contenant une solution saturée d'iode métallique dans l'eau distillée. Laisser en contact une heure.

3° Laver à l'eau.

4° *Coloration.* — Placer la lamelle pendant trente minutes dans le violet de gentiane aniliné.

5° Laver à l'eau, examiner, sécher, monter dans le baume.

Ce procédé donne des résultats satisfaisants, mais il n'est pas assez expéditif pour pouvoir être employé couramment.

G. — PROCÉDÉ DE SCLAVO.

Mordançage. — 1° Déposer sur la lamelle une grosse goutte du mordant suivant :

Alcool à 50°....	100 centimètres cubes.
Tanin....	1 gramme.

Laisser en contact une minute, puis laver à l'eau.

2° Déposer sur la lamelle une goutte de la solution suivante :

Acide phospho-tungstique....	5 grammes.
Eau....	100 centimètres cubes.

3° Laisser en contact une minute. Laver rapidement à l'eau.

4° *Coloration.* — Mettre sur la lamelle une goutte de violet de gentiane aniliné; chauffer jusqu'à apparition de vapeurs pendant trois à cinq minutes.

5° Laver, examiner, sécher, monter dans le baume.

Le procédé de Sclavo échoue à colorer les cils d'un certain nombre de microbes, particulièrement ceux du *V. du choléra*; nous n'avons pas davantage réussi à colorer par ce moyen les cils du *Bacterium coli.*

CHAPITRE X

INOCULATIONS

Article I. — CHOIX DES ANIMAUX.

Les animaux destinés à être inoculés sont choisis, de préférence parmi les mammifères, plus rarement parmi les autres vertébrés, d'après des considérations de plusieurs sortes.

1° **Réceptivité**. — Il faut, avant tout, choisir un animal se prêtant à l'expérience qu'on entreprend ; pour produire une maladie expérimentale, il faut s'adresser à un animal réceptif à l'agent virulent ; parfois, au contraire, on prend un animal réfractaire et, par divers moyens, on s'efforce de lui faire perdre l'immunité dont il jouit. Il faut donc être fixé sur la réceptivité des différents animaux d'expérience ; dans la deuxième partie de cet ouvrage, nous indiquerons les espèces réceptives aux principaux microbes. Quand on étudie un microbe nouveau et que l'on veut déterminer ses propriétés pathogènes, on conçoit qu'il y ait intérêt à multiplier les inoculations et à s'adresser au plus grand nombre possible d'espèces animales.

2° **Considérations économiques**. — Dans la majorité des cas, on utilise de petits animaux, que l'on peut se procurer facilement, à bas prix, conserver et nourrir à peu de frais et, au besoin, faire reproduire au laboratoire.

3° **Maniement**. — On s'adresse de préférence à des animaux de mœurs douces, faciles à manier et ne nécessitant pas l'emploi d'appareils de contention compliqués.

Les petits rongeurs, tels que le *lapin*, le *cobaye*, la *souris blanche*, sont les plus employés ; on se les procure facilement, et ils sont réceptifs vis-à-vis de la plupart des microbes pathogènes. Ce sont eux que l'on désigne d'ordinaire par le terme : *animaux de laboratoire*.

On utilise encore le *rat blanc*, la *souris grise*, le *surmulot*, et aussi la *grenouille*, le *chien*, peu réceptifs vis-à-vis des microbes pathogènes pour l'homme, le *chat*, difficile à manier, les *oiseaux*, le *mouton*, la *chèvre*, le *singe*, l'*âne*, le *cheval* et les *bovidés*.

Article II. — CONSERVATION DES ANIMAUX.

L'écurie doit être spacieuse, bien aérée, pourvue de conduites d'eau permettant d'y opérer de fréquents lavages.

Les cages seront, autant que possible, métalliques ; il est préférable qu'elles ne soient pas superposées, les liquides des cages supérieures pouvant alors souiller les cages inférieures. Si le défaut d'espace forçait à superposer les cages, il serait nécessaire d'interposer entre les différents étages un plancher métallique incliné et pourvu de chéneaux pour permettre l'écoulement des urines. Le fond des cages est toujours à claire-voie.

Les animaux et particulièrement les lapins, souris et rats sont sensibles au froid et à l'humidité ; l'écurie doit être sèche et susceptible d'être chauffée en hiver.

Les cages seront nettoyées chaque jour ; après chaque décès, elles seront lavées avec une solution antiseptique forte (crésyl, phénol) ou flambées avec un fort bec de gaz ou de l'alcool à brûler.

Les animaux inoculés doivent être isolés ; à la porte de leur cage on fixe une étiquette indiquant la nature et la date de l'inoculation.

Les lapins, cobayes, rats blancs et souris blanches se reproduisent facilement au laboratoire ; il est bon de séparer les mâles des femelles pleines car ils détruisent souvent les nichées ; cette précaution, indispensable pour le lapin et la souris, est moins utile pour le rat blanc et surtout pour le cobaye.

Les rats gris, les souris de maison ou des champs, doivent, en règle, être conservés séparément ; quand on réunit plusieurs individus dans une même cage, ils se battent et se tuent fréquemment. Ces animaux seront placés dans de grands bocaux à large ouverture fermés par un couvercle en toile métallique assujetti autour du goulot au moyen d'un cercle de fil de fer.

Les rats blancs, d'ordinaire très doux, peuvent être placés dans des cages en fer à grillage serré, ou même dans des caisses en bois avec porte en toile métallique ou des cages à oiseaux.

Les souris blanches seront conservées dans des bocaux de verre ou dans des caisses métalliques, telles que des boîtes à Palmers, dont le couvercle aura été percé de nombreux trous. Ces boîtes et bocaux doivent être munis d'une couche de sciure de bois épaisse de plusieurs centimètres et d'une certaine quantité d'ouate, les souris redoutant le froid.

A la température ordinaire, la conservation des grenouilles est aisée ; il n'en est pas de même aux températures de 35°-37° fréquem-

ment nécessitées par les besoins de l'expérimentation : dans ces conditions, les animaux meurent souvent en un ou deux jours, sans aucune intervention. Ledoux-Lebard indique le procédé suivant pour conserver les grenouilles pendant plus d'un mois à 35°-37°. Choisir *Rana esculenta* de préférence à *Rana temporaria*; placer autant que possible un seul individu à la fois dans un large bocal contenant quelques centimètres d'épaisseur d'eau et recouvert de mousseline solide fixée par un tour de ficelle; remplacer chaque jour le liquide par de l'eau à la même température; nourrir l'animal une fois par semaine par gavage avec du filet de bœuf, de la viande de veau ou des vers de vase.

Il est inutile d'insister sur la nourriture des animaux tels que poules, lapins, cobayes, chiens, équidés, bovidés. Les souris et les rats recevront du grain et du pain mouillé; les rats blancs aimant beaucoup l'eau, on devra en déposer une petite écuelle dans leur cage.

Les animaux de laboratoire sont sujets à un certain nombre de maladies contagieuses qui dépeuplent quelquefois les écuries; il importe de connaître les plus fréquentes de ces affections.

Abcès. — Les lapins présentent fréquemment, sur les diverses régions du corps, des abcès volumineux formés par un pus concret et fétide et qui entraînent à la longue un état cachectique et la mort. Cette affection est contagieuse.

Isoler l'animal malade; désinfecter la cage avec soin. Ouvrir l'abcès, le vider, au besoin en gratter les parois à la curette; puis pratiquer des irrigations et des pansements antiseptiques.

Acarus des oreilles. — Un acarus se développe parfois dans le conduit auditif du lapin; bientôt il envahit l'oreille moyenne et détermine des troubles nerveux graves : mouvements giratoires, convulsions, crises épileptiformes, qui aboutissent à la mort. On aperçoit dans les oreilles du lapin malade des croûtes jaunâtres qui, portées sous le microscope (oc. I, obj. IV), se montrent constituées par quelques débris amorphes et de très nombreux acarus. L'affection est éminemment contagieuse; elle est curable à la condition d'être traitée dès le début.

Aussitôt qu'un cas a été constaté dans une écurie, isoler et traiter le malade; désinfecter la cage qu'il occupait et les cages voisines et examiner fréquemment les oreilles de tous les autres lapins de l'écurie. Dès qu'on a constaté la présence de l'acarus dans l'oreille d'un animal, commencer le traitement : chaque jour débarrasser le conduit auditif des croûtes à l'aide d'un écouvillon formé par un peu d'ouate enroulée sur un petit bâton, puis faire tomber dans

l'oreille quelques gouttes d'une solution à 5 p. 1000 de polysulfure de potassium (foie de soufre).

Septicémies. — Les lapins et les cobayes sont exposés à des épizooties qui, trop souvent, ravagent les écuries en quelques jours.

Le plus souvent les lapins et les cobayes sont frappés en même temps : ils présentent du jetage, de la diarrhée, puis le poil se hérisse, l'animal se pelotonne et la mort arrive rapidement. A l'autopsie on trouve des lésions de broncho-pneumonie ; l'affection semble due à un petit bacille ressemblant, quant à la forme, à celui de Pfeiffer.

Une autre épizootie, due également à un bacille (Voy. 2e Partie, ch. v), atteint parfois le lapin ; l'infection se fait par le tube digestif au moyen des matières fécales souillant le plancher des cages et les aliments. Les animaux succombent rapidement après avoir présenté de la diarrhée et de la torpeur ; à l'autopsie on constate des épanchements dans les plèvres, le péricarde et le péritoine, de la congestion du poumon et de l'intestin, etc.

Dès qu'une de ces septicémies apparaît dans une écurie, isoler les animaux malades et suspects et désinfecter l'écurie avec soin ; il est même préférable, surtout quand on possède des animaux auxquels l'on tient particulièrement (expériences en train, vaccinations, etc.), de transporter immédiatement les animaux restés sains dans un autre local et de les placer dans des cages désinfectées ; encore sera-t-il souvent difficile, quoi qu'on puisse faire, d'arrêter la marche de l'épidémie.

Coccidiose. — Le lapin est fréquemment infesté par le *Coccidium oviforme* (Voy. *Sporozoaires*). La maladie est particulièrement redoutable chez les jeunes sujets : il importe de la connaître pour ne pas être exposé à de fausses interprétations.

Article III. — PRÉHENSION ET CONTENTION DES ANIMAUX.

La plupart des animaux se défendent quand on les saisit et usent de leurs dents et de leurs griffes contre l'agresseur ; il importe de se mettre à l'abri de ces blessures qui peuvent être dangereuses quand l'animal est atteint d'une maladie transmissible à l'homme (rage, par exemple). Un bon expérimentateur ne doit jamais être blessé par les animaux qu'il manie.

La *contention* peut être *manuelle*, et pratiquée par l'opérateur lui-même ou par un aide ; ce procédé suffit pour maintenir la plupart des animaux pendant les inoculations sous-cutanées ; mais pour pratiquer certaines inoculations délicates dans le péritoine, les mé-

ninges, les veines, etc., ou injecter un virus dangereux tel que celui de la morve ou de la rage, on a recours à la *contention instrumentale* pratiquée à l'aide d'appareils appropriés à chaque espèce animale. Dans le maniement des petits animaux on doit s'exercer à se passer d'aide autant que possible.

LAPIN.

Préhension. — Le lapin doit être saisi par la peau du dos ou par une seule oreille ; ce sont les seuls procédés qui permettent de se mettre à l'abri de ses griffes.

Contention manuelle. — Le plus souvent l'opérateur se contente de placer l'animal sur ses genoux et de le maintenir avec la main gauche pendant que la droite pousse l'injection.

Si le sujet est peu docile, l'opérateur le saisit avec la main droite par la peau du dos et le place sous son bras gauche de facon que la tête et les pattes antérieures pendent en arrière dans le vide, le tronc étant maintenu par l'avant-bras et les pattes postérieures fixées par la main gauche ; la main droite de l'opérateur devient alors libre et peut pousser l'injection.



Fig. 105. — Contention simple du lapin par les deux mains d'un seul aide.

Quand on dispose d'un aide, il saisit le lapin comme l'indique la figure 105, la main gauche maintenant les pattes et la droite la tête.

Contention instrumentale. — Le procédé le plus simple consiste à envelopper l'animal jusqu'au cou dans une serviette ou une large bande de toile en lui ramenant les pattes sous le corps. On peut ainsi opérer sur la tête et les oreilles. Pour pratiquer une inoculation sur une patte, on laisse celle-ci hors de la serviette et on la maintient en extension à l'aide de la main gauche.

Pour obtenir une immobilisation complète, on a recours à divers

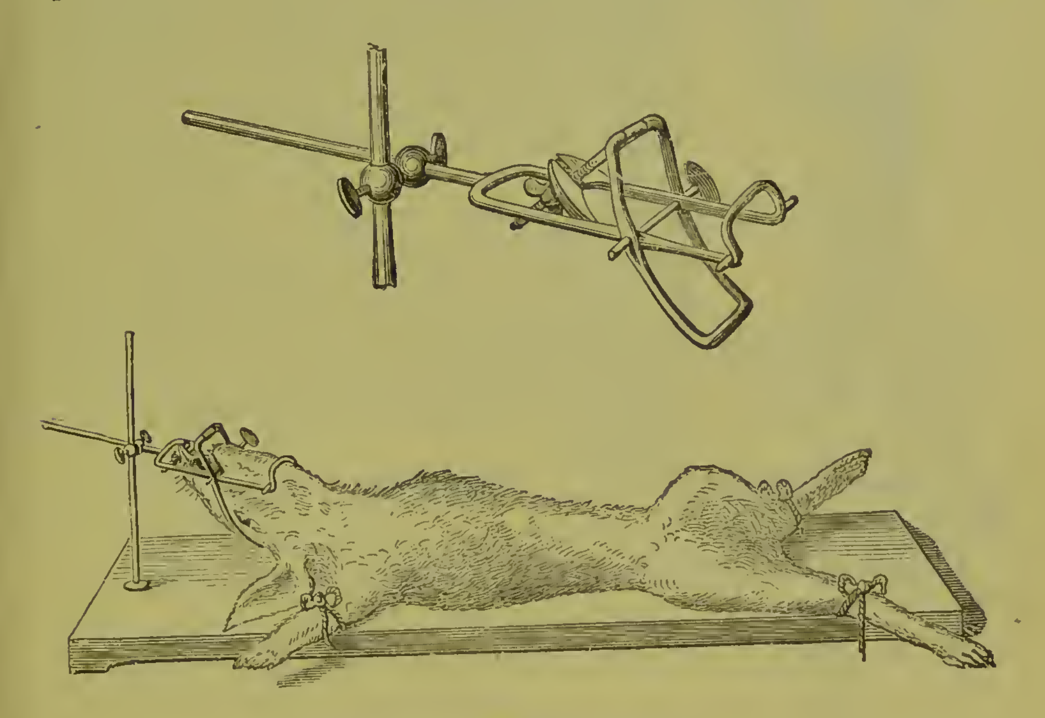


Fig. 106. — Appareil de Czermak.

appareils; nous citerons ceux de Malassez, de Czermak (fig. 106), de Piorkowski, de Latapie et de Debrandt (1) ; ces deux derniers, applicables à la contention de tous les petits animaux, sont fort ingénieux, mais compliqués et coûteux.

Procédé recommandé. — L'appareil le plus simple et le meilleur consiste en un plateau rectangulaire en zinc, muni d'un rebord percé sur son pourtour de trous espacés de 2 à 3 centimètres (fig. 108).

Placer l'animal sur le plateau, engager un de ses membres inférieurs dans un nœud coulant (fig. 107) formé par une ficelle ou mieux un lacet de cuir, serrer au-dessus du carpe, passer un des chefs du lien dans un trou voisin d'une extrémité du plateau et le nouer avec l'autre chef. Lier de même, à un trou de l'autre extré-

(1) Voy. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894 et 1900.

mité du plateau, le membre supérieur du côté opposé. Terminer en fixant les deux membres restés libres. L'animal est parfaitement immobilisé ; la tête peut être maintenue par un aide ou fixée avec une cordelette passant par la barre, en arrière des incisives, et dont les deux extrémités sont liées, en avant, dans deux des trous du plateau.

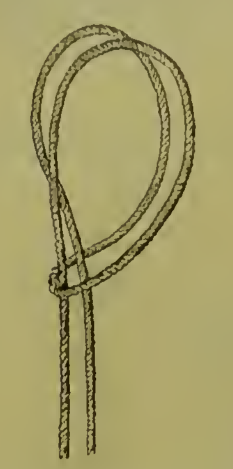


Fig. 107. — Préparation du nœud coulant pour fixer le lapin sur le plateau à vivisections.

On peut encore maintenir la tête avec l'anneau de Ranvier; une tige de fer horizontale *a* se meut sur une tige verticale *b* à l'aide d'une double articulation qui permet de la fixer dans toutes les positions ; la tige *a* est terminée par un anneau perpendiculaire à son axe; sur cet anneau peuvent se déplacer deux petits crochets à l'extrémité desquels s'adapte un lien de caoutchouc. Placer le museau de l'animal dans l'anneau, fixer le lien de caoutchouc à l'un des crochets, le faire passer derrière les oreilles et en attacher l'extrémité au second crochet.

L'appareil s'adapte sur le plateau à l'aide d'une coulisse et d'une vis à pression.

L'animal peut être placé à volonté sur le dos ou sur le ventre.

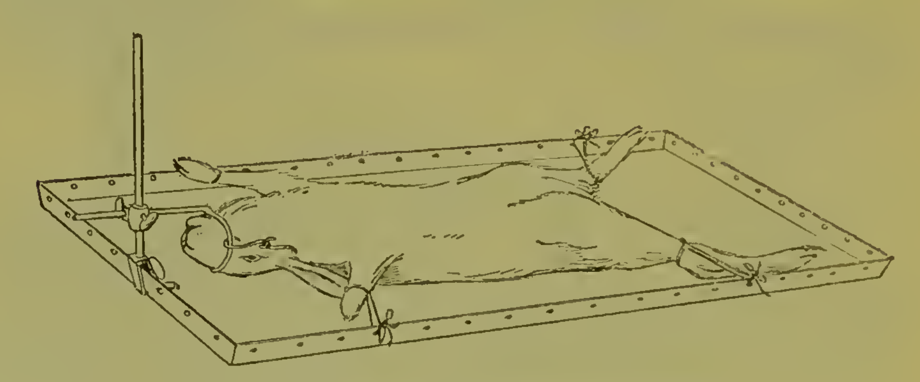


Fig. 108. — Plateau pour immobiliser le lapin.

Anesthésie. — Le lapin est très sensible aux anesthésiques. Il faut se garder de lui administrer du chloroforme lentement, à petites doses : on le tue ainsi à peu près à coup sûr ; au contraire, en lui donnant d'emblée une forte dose, et en suspendant l'inhalation après quelques instants, on évite presque toujours les accidents.

Faire un cornet avec un morceau de papier filtre, y verser une cuillerée à café de chloroforme et en coiffer le museau de l'animal.

Au bout de quelques secondes, les mouvements respiratoires s'arrêtent, puis ils reparaissent bientôt : dès ce moment l'anesthésie est complète, suspendre l'administration du chloroforme et pratiquer rapidement l'opération.

COBAYE.

Préhension. — Le cobaye est plus aisé à manier que le lapin ; on doit le saisir de préférence par la peau du dos.

Contention manuelle. — Elle suffit dans la plupart des cas ; maintenir l'animal avec la main gauche pendant que la droite pousse l'injection.

Contention instrumentale. — Le procédé le plus simple consiste à saisir l'animal par la peau du dos avec une forte pince à pression dont les mors ont la forme d'anneaux (fig. 109) ; la pince étant fixée au cran d'arrêt, on passe l'œil d'une de ses branches sur un clou fiché dans le mur : l'animal ainsi suspendu se trouve parfaitement immobilisé.



Fig. 109. — Pince pour la contention des petits animaux.

Pour les opérations délicates, fixer l'animal sur le plateau en zinc que nous avons décrit précédemment. Il est bon de posséder des plateaux de deux tailles, des grands pour les lapins, des petits pour les cobayes.

Anesthésie. — Le cobaye est moins sensible au chloroforme que le lapin, mais on a rarement l'occasion de l'anesthésier. On opérerait comme pour la chloroformisation du lapin.

SOURIS BLANCHE ET RAT BLANC.

Préhension. — Ces animaux sont le plus souvent maniables et peuvent être saisis avec les doigts par la queue ; parfois ils se défendent et font des morsures douloureuses, on les prendrait alors par la queue ou par la peau de la nuque avec une pince à forcipressure.

Contention. — Le seul procédé recommandable consiste à saisir l'animal par la queue avec une pince ou avec les doigts ; attirer alors la queue hors du bocal, l'animal étant suspendu la tête en bas, et placer une planchette sur l'ouverture du bocal de façon à ne laisser passer que la queue et à se mettre à l'abri des morsures. On peut alors pratiquer l'inoculation à la base de la queue. Pour ino-

culer au niveau d'un membre postérieur, on ferait également sortir ce membre du bocal à l'aide d'une pince.

Anesthésie. — Pour toutes les opérations délicates il est préférable d'anesthésier l'animal. Les rats et les souris succombent facilement sous le chloroforme, mais supportent bien l'éther.

On introduit l'animal sous une cloche à côté d'un petit tampon d'ouate hydrophile imbibé d'éther; on peut aussi projeter directement le tampon dans le bocal où se trouve l'animal. Dès que celui-ci tombe privé de mouvements, le retirer du flacon et le fixer sur un petit plateau ; pour le rat, compléter au besoin la contention avec le mors de Ranvier pour rat. On peut prolonger l'anesthésie en faisant inhaler de temps en temps un peu d'éther.

RAT GRIS.

Préhension. — Le rat gris se défend énergiquement et fait de cruelles morsures; on ne peut le saisir qu'avec les pinces longues et fortes que nous avons décrites plus haut.

Introduire une pince dans le bocal où se trouve l'animal et le saisir rapidement, où l'on peut. Aussitôt le rat se jette sur la pince et la mord ; profiter de ce moment pour poser une seconde pince sur la peau de la nuque. Fixer solidement les deux pinces et sortir l'animal du bocal.

Contention. — Un aide tient l'animal avec les deux pinces, il incline le long de la colonne vertébrale la pince de la nuque, ramène la queue à côté de cette pince et la maintient de la même main. De l'autre main il tient la deuxième pince sur laquelle il tire légèrement de façon à mettre l'animal dans l'impossibilité de se servir de ses dents ; si cette deuxième prise était mauvaise, on placerait une autre pince sur la peau qui recouvre la mâchoire inférieure. L'opération terminée, ne desserrer les pinces qu'après avoir reporté le rat dans son bocal.

Anesthésie. — Doit toujours être employée pour les inoculations difficiles ou dangereuses. Introduire dans le bocal où se trouve l'animal un tampon d'ouate imbibé d'éther et opérer comme nous l'avons dit à propos du rat blanc.

CHIEN.

Préhension. — Si le chien est docile, lui parler, le flatter puis le saisir solidement par la peau du cou.

En présence d'un chien hargneux, farouche, utiliser pour la préhension une *pince à collier*, longue pince en fer dont les mors for-

ment en se réunissant un collier avec lequel on enserre le cou de l'animal. On peut encore employer le procédé de la *demi-strangulation*; on jette un nœud coulant autour du cou du chien et on serre le nœud en prenant un point d'appui sur un barreau de la cage, un poteau, etc.; l'animal tombe demi-asphyxié, on profite de ce qu'il est en résolution pour le museler et lui lier les pattes.

Musellement. — On ne doit jamais pratiquer une opération sur un chien sans l'avoir muselé.

Le procédé le plus simple consiste à passer une cordelette solide dans la gueule de l'animal en arrière des canines, à faire un nœud simple au-dessous du maxillaire inférieur, puis à ramener les deux chefs de la corde sur le museau où on les fixe par un double nœud (fig. 110).

On peut encore placer dans la gueule, en arrière des canines, une tige de fer ronde, puis avec une cordelette faire deux tours sur le museau, en arrière du bâillon, serrer et nouer solidement (fig. 111).



Fig. 110. — Musellement du chien; procédé de la ficelle.



Fig. 111. — Musellement du chien avec une forte ficelle placée en arrière d'un mors de fer (Claude Bernard).

Quand on se propose de faire le cathétérisme de l'œsophage, pour injecter un produit directement dans l'estomac, il faut museler l'animal la gueule ouverte. On utilise dans ce cas le mors à double branche transversale de Claude Bernard; la figure 112 indique le mode d'application de cet instrument.

On peut remplacer ce mors par un bâillon rectangulaire en bois, de dimensions appropriées à la taille du chien et percé d'un trou à son centre. Après avoir placé ce bâillon dans la gueule, en arrière des canines, on fixe les mâchoires par le procédé de la cordelette.

Contention. — Le musellement, joint à la contention manuelle, suffit dans la plupart des cas; pour les opérations longues, il faut

Fig. 112. — Disposition du mors à double branche transversale permettant de tenir ouverte la gueule de l'animal installé sur la gouttière brisée.



Fig. 113. — Chien fixé sur le dos sur la table à vivisections.

maintenir l'animal à l'aide de la gouttière de Cl. Bernard ou plus simplement en le fixant par les pattes, comme nous l'avons dit pour le lapin, sur une table en bois épais, percée de trous ou munie de crochets pour le passage des liens (fig. 113 et 114).

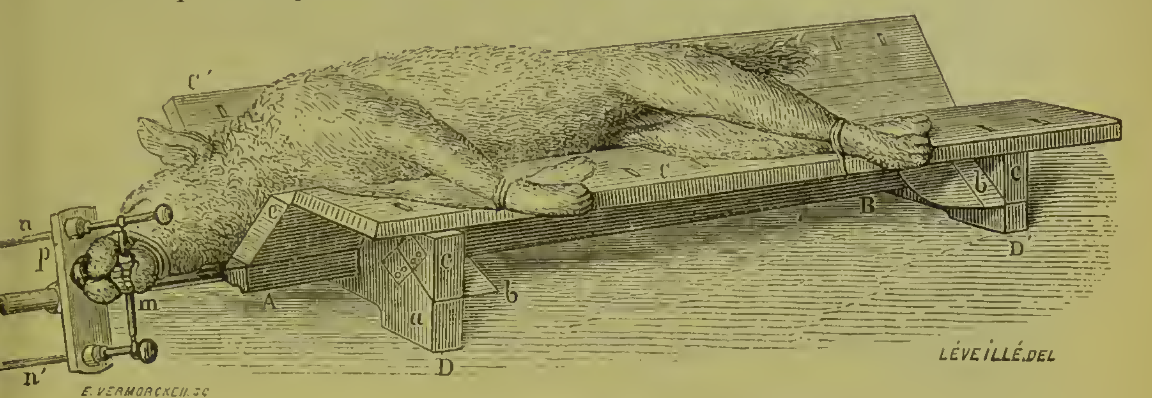


Fig. 114. — Gouttière brisée (Claude Bernard).

Anesthésie. — On a rarement occasion d'anesthésier le chien dans les opérations bactériologiques. Le chien tolère bien le chloroforme, à la condition qu'on ne lui donne pas de doses massives et que le liquide ne vienne pas au contact de sa muqueuse nasale.

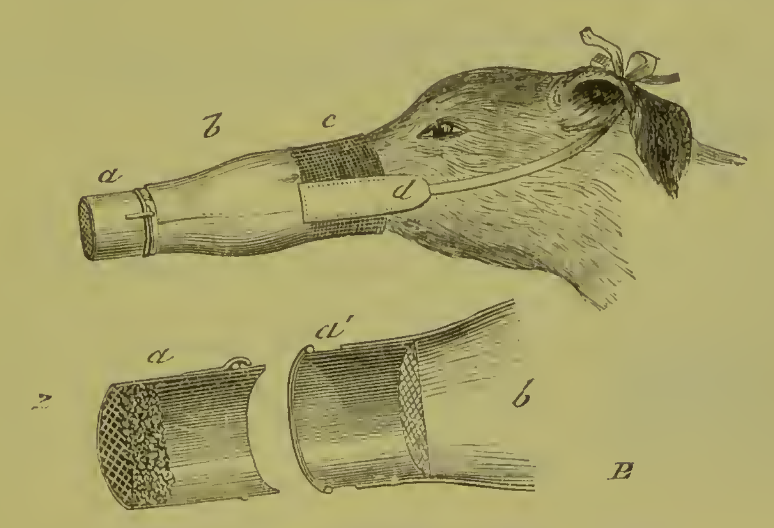


Fig. 115. — Muselière pour l'anesthésie du chien.

On utilise d'ordinaire, pour pratiquer l'anesthésie, une muselière allongée, terminée par une petite boîte grillée *a* dans laquelle on place une éponge imbibée de chloroforme. On suspend et on reprend à volonté l'administration de l'anesthésique en enlevant ou en replaçant cette boite sur la muselière (fig. 115). Commencer par de petites doses ; l'anesthésie est obtenue au bout de huit à quinze minutes.

CHAT.

Le chat est très difficile à manier ; on l'utilise rarement.

Si l'animal se laisse prendre, le caresser et le saisir fortement par la peau du dos. Si le chat est farouche, on devra recourir au procédé de la demi-strangulation.

Pour pratiquer l'opération, le mieux est d'anesthésier l'animal ; pour cela, aussitôt qu'il est saisi, on le projette dans un bocal à large ouverture dans lequel on a placé une éponge imbibée de chloroforme et que l'on couvre immédiatement. Le chat est très sensible au chloroforme ; il faut le retirer du bocal dès qu'il tombe ; l'anesthésie persiste plusieurs minutes sans administration nouvelle de chloroforme. L'animal endormi peut être fixé sur la table à vivisections.

On peut encore envelopper le chat dans une longue pièce de toile en lui ramenant les pattes sous le ventre, puis plonger dans un sac la tête et la moitié antérieure du corps ; ce procédé est excellent pour les inoculations sur le train postérieur, les injections rectales, etc.

SINGE.

Le singe est assez difficile à manier ; on peut l'immobiliser comme le chien ; il est préférable de le chloroformer si l'opération doit durer quelque temps.

CHEVAL ET ANE.

Le plus souvent, le cheval peut être inoculé sans qu'on ait à employer de moyens spéciaux de contention, il suffit qu'un aide le maintienne par le bridon ou le licol ; si le cheval est ombrageux, on lui couvre les yeux ; s'il se défend, on emploie le tord-nez ou l'on fait tenir un membre antérieur en flexion par un aide accoutumé à manier les chevaux. Pour les opérations plus longues, on entrave et abat l'animal par les procédés usités en art vétérinaire.

BOVIDÉS.

La contention des bovidés est d'ordinaire aisée ; pour les opérations longues, on couche l'animal sur la table à inoculations vaccinales.

OISEAUX.

Les oiseaux de basse-cour ordinairement utilisés sont maintenus facilement avec la main ; on peut aussi les fixer par les pattes et les ailes sur le plateau en zinc décrit page 161.

Remarque. — Après chaque opération, les mors, bâillons, plateaux, etc., seront nettoyés avec soin et lavés avec une solution de crésyl ou de phénol.

ARTICLE IV. — INOCULATIONS.

§ 1er. — INSTRUMENTATION.

Nous n'insisterons pas sur les instruments, d'usage banal, qui servent à inciser la peau, à dénuder les vaisseaux, etc. Avant chaque opération, les bistouris, ciseaux, pinces, écarteurs, aiguilles de Deschamps, aiguilles à suture, etc., doivent être plongés pendant environ dix minutes dans de l'eau portée à l'ébullition, puis être placés dans une solution d'oxycyanure de mercure à 1 p. 1 000. Après l'opération, les instruments sont nettoyés, puis passés à l'alcool et séchés avec un linge fin.

L'opérateur doit avoir à sa disposition de l'ouate hydrophile et du fil stérilisés.

Préparation du fil stérilisé. — On choisira de préférence du cordonnet fin de soie tressée.

a. On peut stériliser le fil au moment de l'utiliser, en le plongeant pendant environ quinze minutes dans de l'eau phéniquée à 3 p. 100 portée à l'ébullition. Mais il est préférable de tenir une provision de fil prête d'avance en adoptant un des deux procédés suivants.

b. Couper le fil en aiguillées de 0m,30 environ; préparer des petits paquets contenant chacun trois ou quatre aiguillées de fil et enveloppés dans deux ou trois doubles de papier filtre. Porter les paquets pendant vingt minutes à l'autoclave à 120°, puis les sécher à l'étuve et les conserver dans une boîte ou un flacon bien fermés. Ouvrir les paquets un à un, au moment même du besoin. Tout paquet ouvert et non utilisé de suite doit être rejeté.



Fig. 116. — Flacon pour conserver le fil stérilisé.

c. Dans un petit flacon placer le peloton de fil et quelques gouttes d'eau; faire passer le bout du fil dans un tube de verre traversant le bouchon du flacon (fig. 116) et contenant un tampon d'ouate serré. Le fil passe à frottement entre la paroi du tube et l'ouate. Stériliser le tout à l'autoclave. Au moment du besoin, il suffit de tirer sur le bout du fil pour dévider le peloton; avoir soin de rejeter l'extrémité du fil qui émergeait du tube; le fil se conserve stérile dans le flacon.

On doit encore avoir à portée de la main une solution antiseptique (oxycyanure de mercure à 1 p. 1 000) et de l'eau stérile.

Préparation de l'eau stérile. — Préparer d'avance des tubes à essai ou des flacons de 50 à 100 grammes, aux trois quarts pleins d'eau et stérilisés à l'autoclave à 115°. Au moment du besoin, puiser dans le flacon à l'aide d'une pipette Pasteur. Tout flacon ou tube ouvert et non utilisé immédiatement doit être rejeté.

On peut encore stériliser l'eau dans des matras répartiteurs (fig. 27), mais il vaut mieux utiliser des récipients de petites dimensions, dont le contenu ne sert que pour une opération ; on évite ainsi toute chance de souillure.

Préparer également d'avance des verres flambés, des agitateurs, des öses, des pipettes Pasteur.

Enfin, pour porter les virus à l'intérieur des tissus, il est indispensable de posséder des instruments spéciaux : *seringues* et *aiguilles*.

SERINGUES A INOCULATIONS.

Il existe de nombreux modèles de seringues pour les inoculations ; cette abondance même prouve combien il est difficile d'obtenir un instrument parfait possédant toutes les qualités requises. Ces qualités sont les suivantes :

1° La seringue doit être stérilisable par l'eau bouillante ou la vapeur sous pression.

2° Le piston et les joints doivent être parfaitement étanches et suffisamment résistants pour ne pas nécessiter des remplacements fréquents.

3° La seringue doit porter une graduation sur la tige du piston ou sur le corps en verre.

Seringue de Pravaz. — Le modèle le plus ancien et le meilleur au point de vue de l'étanchéité est la seringue de Pravaz ; malheureusement les joints et le piston en cuir ne supportent pas la température de l'eau bouillante, ce qui fait rejeter l'usage de cette seringue. On pourrait l'utiliser, en la désinfectant par une immersion de plusieurs heures dans une solution phéniquée à 5 p. 100, suivie d'un rinçage à l'eau stérile.



Fig. 117. — Pipette Pasteur disposée pour pratiquer les inoculations.

Pipette Pasteur. — L'instrument le plus simple consiste en une pipette Pasteur à effilure courte, pointue et légèrement courbe (fig. 117); on aspire le liquide à inoculer dans la pipette ; on traverse la peau avec la pointe effilée et on détermine la pénétration du liquide dans les tissus en soufflant par l'extrémité fermée à l'ouate. Cet appareil peut suffire dans un grand nombre de cas.

Seringues à piston d'air. — Koch, Petri, etc., ont supprimé le piston; le cylindre de verre qui constitue le corps de la seringue porte à une de ses extrémités l'aiguille et à l'autre une poire en caoutchouc. En comprimant la poire on détermine la pénétration du liquide, mais, quand on injecte dans un tissu à trame serrée, le liquide ne pénètre pas ou reflue dès qu'on enlève la seringue. Ces instruments sont à rejeter.

Seringue de Straus. — Straus remplace dans la seringue de Pravaz le cuir du piston par de la moelle de sureau comprimée, et obtient un instrument supportant très bien les températures de l'eau bouillante et de l'autoclave.

On peut changer le piston aussi souvent qu'il est nécessaire; cette manœuvre facile est cependant un peu longue; d'ailleurs ce remplacement s'impose souvent, car la moelle de sureau perd rapidement son élasticité. Avec cette réserve, c'est là un bon appareil.

Remplacement du piston. — Prendre un morceau de moelle de sureau à grain fin et régulier, enlever avec un bistouri sa couche fibreuse externe, le comprimer avec les doigts dans son sens longitudinal de manière à l'aplatir autant qu'il est possible, puis y découper un petit cylindre entrant à frottement très dur dans le corps de la seringue, le perforer au centre avec une aiguille rougie dans la flamme et le fixer sur l'extrémité de la tige du piston. Avec une lime très fine polir les faces latérales de ce cylindre et l'introduire dans le corps de la seringue. Une immersion de quelques instants dans l'eau gonfle la moelle de sureau et rend le piston étanche; on peut d'ailleurs le comprimer à volonté à l'aide de la vis moletée qui termine la tige en dehors de la seringue.

Roux a modifié cette seringue; dans le modèle qu'il recommande, le corps est constitué par un cylindre de verre dont l'extrémité inférieure est étirée et rodée pour recevoir l'aiguille sans intermédiaire d'aucune sorte; le piston peut entrer et sortir librement du tube, celui-ci ne portant à sa partie supérieure, en guise de douille, qu'un simple bouchon.

Seringues de Malassez. — Il en existe plusieurs modèles; les seuls recommandables sont ceux dont le piston est constitué par un mélange de caoutchouc et d'amiante ou par de la *fibre*, substance composée de cellulose et de caoutchouc. La partie inférieure du corps de la seringue est étirée et rodée et s'adapte à l'aiguille par l'intermédiaire d'une garniture en fibre.

Seringue de Felizet. — C'est une seringue de Pravaz dans laquelle le piston est constitué par un anneau de caoutchouc maintenu entre deux plateaux métalliques, la tige du piston étant munie d'un écrou permettant de serrer cet anneau à volonté. L'aiguille est fixée sur la douille de la seringue, non à frottement, mais au moyen d'un

pas de vis très allongé, de telle sorte qu'un seul tour assure la fixation. Cet instrument est très défectueux; le piston grippe, s'altère facilement, le joint de l'aiguille n'est pas étanche.

Seringue à piston métallique. — On a essayé de remplacer les pistons élastiques par des pistons rigides constitués par des tiges métalliques exactement calibrées; le seul modèle de ces instruments que nous ayons eu entre les mains était très peu satisfaisant et laissait refluer le liquide entre le cylindre et le piston.

Seringue de Roux. — Roux a fait construire pour les inoculations sérothérapiques une seringue de contenance de 20 centimètres cubes, dont le piston est constitué par une préparation à base de caoutchouc. L'aiguille est réunie à la douille par un tube de caoutchouc long de 10 centimètres environ; cette disposition permet de pousser l'injection sans risquer de déplacer l'aiguille. Pour stériliser la seringue, avoir soin de desserrer d'abord la douille supérieure pour donner du jeu au cylindre de verre qui constitue le corps de la seringue et éviter qu'il n'éclate par la dilatation.

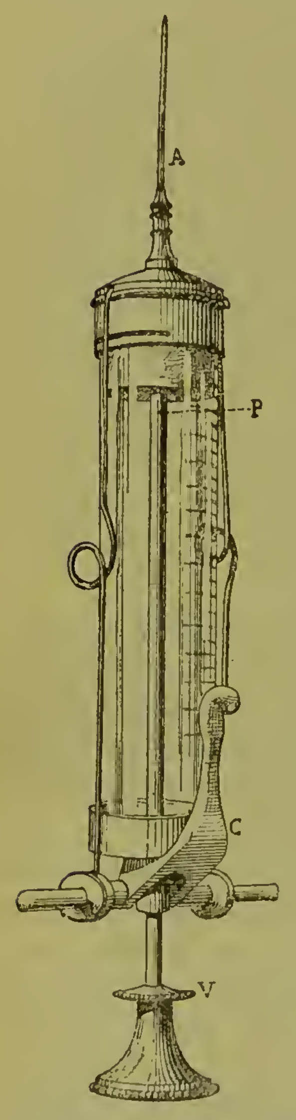


Fig. 118. — Seringue de Debove.

Seringue de Debove. — La seringue de Debove (fig. 118) est la meilleure à notre avis; très maniable, facilement stérilisable, solide et d'une étanchéité parfaite, elle convient pour toutes les inoculations.

Elle est constituée par un tube en cristal, gradué en centimètres cubes, exactement calibré et fixé entre deux douilles métalliques, garnies de rondelles d'amiante, par une armature métallique mobile, complètement indépendante et que commande un levier C.

La douille inférieure présente un prolongement conique, destiné à recevoir l'aiguille directement ou par l'intermédiaire d'un ajutage en caoutchouc.

Le piston P est constitué par des rondelles d'amiante maintenues entre deux plaques métalliques; la tige porte un bouton moleté, V, qui permet de faire varier la compression des rondelles de manière à régler le jeu du piston.

On démonte facilement la seringue en élevant le levier C; les

tiges latérales de l'armature se trouvant alors relâchées, on peut dégager celle-ci et enlever les douilles.

Toutes les pièces de l'instrument sont interchangeables, ce qui supprime l'envoi au constructeur pour les réparations. La seringue se construit en plusieurs tailles, de 2 à 100 centimètres cubes; les modèles de 2, 10 et 20 grammes sont les plus ordinairement utilisés.

Stérilisation de la seringue. — Amener le piston au bas de sa course; élever le levier C, de manière à relâcher le ressort et à permettre la dilatation du cylindre de cristal. Placer la seringue et l'aiguille dans un vase contenant de l'eau; porter à l'ébullition pendant quinze à vingt minutes; laisser refroidir, sortir la seringue de l'eau avec une pince flambée, faire écouler l'eau restée au-dessus du piston, abaisser le levier; adapter l'aiguille sur la douille.

L'inoculation faite, rincer la seringue à l'eau froide pour entraîner les matières albuminoïdes que l'ébullition coagulerait, puis faire bouillir l'instrument dans l'eau qui a servi au rinçage : on stérilise du même coup cette eau et la seringue.

La stérilisation peut être effectuée à l'autoclave : on dispose la seringue comme nous venons de le dire et on la porte quinze minutes à 115°. Dans la plupart des cas, l'ébullition suffit pour assurer la stérilisation; on a recours à l'autoclave quand la seringue a servi à inoculer des cultures de bactéries à spores résistantes (Bacille du tétanos, Vibrion septique, etc.).

Appareil pour injections massives. — Dans l'immunisation par les toxines, pour injecter de grandes quantités de cultures filtrées, la seringue n'est plus suffisante et ne permet pas de procéder avec la lenteur nécessaire; on utilise le dispositif suivant.

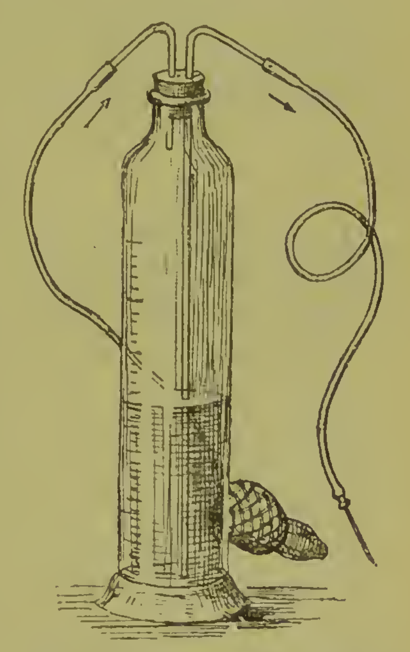


Fig. 119. — Appareil pour injecter de grandes quantités de liquide.

Un flacon de forme haute, portant une graduation gravée sur le verre, de haut en bas, reçoit le liquide à injecter; son bouchon est traversé par deux tubes de verre dont l'un, plongeant jusqu'au fond du flacon, est relié à l'aiguille par un tuyau de caoutchouc; par le second tube, s'arrêtant au-dessous du bouchon et muni d'un tampon d'ouate, on comprime l'air dans le flacon; on obtient ainsi par l'aiguille un écoulement dont on règle la rapidité à volonté.

L'appareil est stérilisé à l'autoclave; puis on y aspire le liquide à inoculer.

AIGUILLES.

On utilise d'ordinaire des aiguilles d'acier; elles ont l'inconvénient de se rouiller et de s'obstruer rapidement quand elles ont été mouillées, ce qu'on évite en les lavant avec soin après l'usage et en les conservant, après ébullition, dans un petit flacon plein d'alcool absolu ou d'une solution de borate de soude à 3 p. 100.

On a proposé de remplacer les aiguilles d'acier par des aiguilles en platine iridié, qui sont inoxydables et peuvent être chauffées au rouge, mais ces aiguilles sont coûteuses et fragiles ; de plus, le peu de résistance du platine oblige à donner un diamètre fort restreint à leur lumière; pour ces raisons, nous préférons les aiguilles d'acier qu'avec un peu de soin on conserve aisément en bon état. Il est nécessaire de posséder des aiguilles de différents calibres et de différentes longueurs.

§ 2. — PRÉPARATION DES MATÉRIAUX D'INOCULATION.

Les substances à inoculer peuvent être solides ou liquides ; la conduite à tenir varie dans chacun de ces deux cas.

A. — SUBSTANCES LIQUIDES.

Les substances liquides les plus fréquemment utilisées sont les cultures en bouillon; on inocule encore du sang, du sérum, des sérosités pleurale, péritonéale, etc.

a. **Cultures.** — *Toute culture, avant d'être inoculée, doit être examinée au microscope*, pour vérifier sa pureté.

Pour l'inoculation, prélever avec une pipette Pasteur une petite quantité de la culture, la verser dans un verre flambé, puis l'aspirer dans la seringue stérilisée et munie de son aiguille; pour cela, on introduit l'aiguille dans le verre, soit en soulevant un peu le papier qui recouvre celui-ci, soit en traversant ce papier avec l'aiguille. Chasser l'air qui a pu s'introduire dans la seringue, en poussant légèrement le piston après avoir redressé l'instrument : avoir soin de tenir à côté de l'aiguille le papier stérile qui recouvrait le verre où l'on a puisé, les gouttelettes de culture sont ainsi recueillies par le papier à la sortie de l'aiguille. Brûler ce papier et stériliser le verre par immersion dans l'eau bouillante.

b. **Humeurs.** — Pour le sang, les sérosités diverses, après les avoir recueillies comme il sera dit aux chapitres XI et XII, les verser à l'aide

de la pipette dans un verre flambé, puis opérer comme ci-dessus. Il est très difficile d'injecter directement du sang, ce liquide se coagulant rapidement et obstruant l'aiguille. Si le virus se rencontre de préférence dans le sérum, on laissera la coagulation se produire, puis on aspirera et injectera le sérum. Au contraire, le virus est-il retenu par les caillots, on traitera ceux-ci comme nous le dirons pour les pulpes d'organes.

B. — SUBSTANCES SOLIDES.

a. **Fragments résistants.** — Les substances solides, telles que fragments d'organes, échardes, etc., peuvent être insérées directement dans les tissus de l'animal : après avoir fait une petite incision, décoller le tissu cellulaire avec un stylet, et dans la pochette ainsi formée introduire le fragment, suturer ou obturer la plaie avec du collodion; on peut inoculer de même dans le péritoine, les muscles, etc.

b. **Cultures sur milieux solides.** — Après avoir chargé une öse de microbes en grattant une culture sur milieu solide, on peut introduire et essuyer cette öse dans les tissus après avoir pratiqué une petite incision de la peau. Mais, le plus souvent, on prépare une émulsion avec la substance à inoculer et un peu d'eau ou de bouillon stériles, de manière à pouvoir pratiquer l'inoculation avec la seringue.

Racler la culture avec une öse forte, porter l'öse dans un verre flambé contenant un peu d'eau stérile et y délayer la culture de manière à obtenir une émulsion homogène. Si la culture est dure, ne se mélange pas à l'eau, on la broie comme il sera dit en *d.*

c. **Pus.** — Le pus est d'ordinaire trop épais pour pouvoir être injecté en nature; en verser quelques gouttes avec une pipette dans un verre stérile, ajouter un peu d'eau ou de bouillon stérilisés, et mélanger intimement avec l'extrémité de la pipette.

d. **Pulpes d'organes.** — Recueillir de la pulpe des organes ou de petits fragments de viscères, centres nerveux, etc. (Voy. chap. XII).

La substance recueillie étant portée dans un verre stérile, avec un agitateur flambé (1) on la broie dans le fond du verre en communiquant des mouvements de rotation à l'agitateur maintenu entre le pouce et l'index de la main droite. Quand on a obtenu une pâte fine, on ajoute goutte à goutte, avec une pipette, un peu d'eau stérilisée

(1) La surface et les angles de section de l'agitateur ne doivent pas avoir été émoussés afin que le broiement soit plus efficace.

et l'on mélange jusqu'à ce que l'émulsion soit fluide et bien homogène.

Il est souvent nécessaire, pour éviter la présence de grumeaux, et surtout quand on doit pratiquer l'injection dans une veine (danger de l'embolie), de filtrer l'émulsion sur un petit morceau de linge fin préalablement stérilisé.

§ 3. — OPÉRATION.

Règles générales. — Avant de pratiquer une inoculation, il faut couper les poils, puis désinfecter la région.

Les poils peuvent être coupés très courts avec les ciseaux courbes, ou mieux rasés ; pour les opérations délicates, il est préférable de pratiquer l'épilation à l'aide d'une des pâtes suivantes :

I.	Chaux récemment décarbonatée et éteinte.....	2 parties.
	Eau	3 —

Faire passer jusqu'à saturation un courant d'hydrogène sulfuré dans ce lait de chaux, en agitant fréquemment. Pour l'usage, appliquer la pâte obtenue sur la partie à épiler, laisser quelques minutes en contact et enlever avec de l'eau et une brosse à ongles :

II.	Sulfure de sodium..........................	3 parties.
	Chaux vive pulvérisée......................	10 —
	Amidon.....................................	10 —

Mélanger. Au moment de l'emploi, délayer un peu de la poudre avec de l'eau, de façon à obtenir une pâte molle, et l'appliquer sur la peau ; au bout de trois à quatre minutes l'épilation est produite.

Dans un grand nombre de cas, après avoir coupé les poils, il suffit, pour aseptiser la peau, de la frotter avec un tampon d'ouate imbibé de solution de sublimé ou d'oxycyanure à 1 p. 1 000 ; pour obtenir une désinfection plus rigoureuse, on lave la peau avec de l'alcoolé de savon et une brosse, puis on fait agir la solution antiseptique et on essuie avec un papier stérile.

I. — INOCULATION ENDERMIQUE.

1° Raser et désinfecter la région.

2° Pratiquer avec le bistouri des scarifications très superficielles, ou enlever l'épiderme en raclant avec la lame du bistouri la peau fixée entre deux doigts.

3° Avec un agitateur flambé ou un peu d'ouate stérile fixée sur une pince à forcipressure, porter le virus sur la partie ainsi préparée, l'étendre et le faire pénétrer par friction.

Dans quelques cas, il suffit de frotter énergiquement la peau, avec un tampon imbibé de virus, sans scarifications ni grattage préalables.

En règle, pratiquer l'inoculation sur une région du corps que l'animal ne puisse atteindre (face dorsale des oreilles, peau du dos, etc.). Ce mode d'inoculation peut être pratiqué chez les différentes espèces animales.

II. — INOCULATION SOUS-CUTANÉE.

A. **Substances liquides.** — 1° Raser et aseptiser la région.

2° Faire un pli en saisissant la peau entre le pouce et l'index de la main gauche; enfoncer l'aiguille à la base de ce pli, pousser l'injection, retirer l'aiguille et s'assurer que le liquide ne reflue pas par le trou de la piqûre.

B. **Substances solides.** — 1° Raser et aseptiser la région.

2° Pratiquer une petite incision cutanée avec le bistouri; à l'aide de la sonde cannelée, décoller le tissu cellulaire sur une étendue suffisante, et dans la logette ainsi obtenue, introduire avec une pince flambée l'objet à inoculer.

3° Placer sur l'incision un ou deux points de suture ou recouvrir la plaie avec un peu de collodion.

Remarques. — L'injection sera pratiquée de préférence sur un point que l'animal ne puisse atteindre, dans le tissu cellulaire de la base de la queue, ou sous la peau du dos ou des oreilles; souvent, cependant, on inocule sous la peau de l'abdomen ou de la cuisse.

Pour les inoculations de substances solides, choisir un endroit où la peau soit très lâche : les flancs, l'aine, par exemple.

III. — INOCULATION DANS LES SACS LYMPHATIQUES.

Chez la grenouille le tissu conjonctif sous-cutané est représenté par de grands sacs, *sacs lymphatiques*, communiquant entre eux. On pratique souvent les inoculations dans ces sacs.

A. **Sac dorsal.** — Il est situé à la partie inférieure du dos. On immobilise l'animal en enveloppant ses pattes postérieures d'un linge; en comprimant avec les doigts les côtés du dos, on fait saillir le sac; enfoncer une aiguille fine obliquement de haut en bas, elle pénètre dans le sac et on pousse l'injection.

B. **Sacs des membres postérieurs.** — Enfoncer l'aiguille obliquement de haut en bas sous la peau au-dessous de l'articulation fémoro-tibiale; on tombe ainsi dans le sac et on pousse l'injection.

IV. — INOCULATION INTRAMUSCULAIRE.

1° Raser et aseptiser la région.

2° Enfoncer profondément l'aiguille dans les masses musculaires; pousser l'injection; retirer l'aiguille.

Chez les mammifères, on inocule de préférence dans les masses musculaires de la cuisse; chez les oiseaux, dans les pectoraux.

V. — INOCULATION INTRAVEINEUSE.

Autant que possible ces injections doivent être pratiquées sur une veine superficielle que l'on n'aura pas besoin de dénuder et qu'il suffira de piquer avec l'aiguille à travers la peau. Ce mode d'inoculation n'est pas praticable chez les petits animaux, tels que la souris.

A. **Lapin.** — 1° Choisir une veine dorsale de l'oreille et de préférence la marginale externe; ne pas s'adresser aux veines médianes, qui, étant immergées dans un tissu cellulaire lâche, fuient sous l'aiguille.

2° Au niveau de la veine, couper les poils avec les ciseaux courbes et aseptiser la peau. Le lapin est placé sur les genoux de l'opérateur et maintenu, s'il est nécessaire, par un aide.



Fig. 120. — Injection dans la veine auriculaire du lapin (premier temps).

Fig. 121. — Injection dans la veine auriculaire du lapin (deuxième temps).

3° Saisir le bord de l'oreille entre l'index et le pouce de la main gauche, de manière à le tendre; placer une pince à pression à la

base de l'oreille pour faire saillir la veine (fig. 120); frotter la peau avec un tampon imbibé d'eau phéniquée : la veine devient turgescente.

4° Avec l'aiguille maintenue dans une position très oblique, presque parallèle à la direction du vaisseau, piquer la paroi veineuse en se dirigeant vers la racine de l'oreille (fig. 121).

5° Quand l'aiguille a pénétré dans la veine, enlever la pince (il est bon de replacer cette pince plus haut, sur l'aiguille elle-même, de manière à bien fixer l'aiguille dans le vaisseau), et pousser lentement l'injection. Si l'aiguille n'avait pas pénétré dans la veine, il se formerait une boule d'œdème dans le tissu cellulaire et il faudrait recommencer plus bas l'opération.

L'injection poussée, retirer l'aiguille ; si la piqûre saigne, maintenir la pince pendant quelques minutes sur la petite plaie.

B. **Cobaye**. — Les veines superficielles n'étant pas assez volumineuses, il faut s'adresser à la jugulaire externe. Cette veine, superficiellement située, recouverte par la peau, le peaussier et du tissu cellulaire, suit une ligne partant de l'angle de la mâchoire pour aboutir au milieu de l'espace séparant l'épaule du sternum.

1° Fixer le cobaye sur le dos, maintenir la tête en extension ; raser et aseptiser la région.

2° Sur le milieu de la ligne de direction de la veine, inciser la peau et le peaussier, écarter le tissu cellulaire avec le bec de la sonde cannelée : la veine apparaît dans la plaie, l'aborder par sa partie externe.

3° Enfoncer obliquement dans la veine l'aiguille (une aiguille dont la partie inférieure est coudée à angle droit convient particulièrement) ; pousser l'injection. Retirer l'aiguille.

4° Toucher la plaie avec un tampon imbibé d'eau phéniquée, s'assurer qu'il ne se produit pas d'hémorragie par la piqûre ; placer sur la peau deux ou trois points de suture et recouvrir la plaie de collodion.

C. **Chien**. — Pratiquer l'inoculation dans la veine externe du membre postérieur (petite saphène).

1° Museler l'animal, le faire maintenir par un aide.

2° Couper les poils de la partie externe de la patte, au niveau du point où les muscles du mollet se continuent avec le tendon d'Achille. Faire comprimer la racine du membre, frotter la région avec un tampon imbibé d'eau phéniquée ; on voit saillir la petite saphène ; elle est facilement abordable à la partie supérieure du tendon d'Achille.

3° Autant que possible, éviter de découvrir la veine par incision

de la peau et pratiquer l'inoculation en traversant du même coup, avec l'aiguille, la peau et la paroi du vaisseau.

D. **Cheval.** — Rechercher et faire saillir la jugulaire comme il a été dit page 50. Pratiquer l'injection selon les règles ordinaires.

E. **Oiseaux.** — Inoculer dans la veine axillaire.

1° L'animal étant fixé, un aide maintient l'aile étendue et en comprime la base. Arracher le duvet qui couvre la peau de la face interne de la racine du membre ; frotter avec un tampon imbibé de solution phéniquée.

2° La veine étant devenue turgescente, y pratiquer l'injection.

VI. — INOCULATION ARTÉRIELLE.

Cette inoculation se pratique, chez les mammifères, dans la fémorale ou la carotide.

A. **Fémorale.** — La fémorale occupe chez les animaux la même position que chez l'homme : au niveau du pli de l'aine, la veine est en dedans, puis vient l'artère et enfin, en dehors, le nerf crural. L'artère suit une ligne allant du milieu du pli de l'aine au côté interne du genou.

1° Fixer l'animal sur le dos, écarter et étendre le membre postérieur; raser et désinfecter la région.

2° Après avoir constaté les battements artériels vers le milieu du pli de l'aine, sur la ligne de direction du vaisseau, inciser la peau et le tissu cellulaire sur une longueur de quelques centimètres.

3° Sectionner sur la sonde l'aponévrose : on aperçoit alors le paquet vasculo-nerveux.

4° Reconnaître l'artère, traverser très obliquement sa paroi avec l'aiguille, pousser l'injection, retirer l'aiguille.

5° Suturer et collodionner la peau.

B. **Carotide.** — A la partie moyenne du cou, la carotide, chez tous les mammifères, se trouve appliquée le long de la trachée dans une gaine qui lui est commune avec la veine jugulaire profonde, le pneumogastrique et le grand sympathique.

1° L'animal étant couché sur le dos, la tête en extension, couper les poils et aseptiser la peau au niveau de la partie médiane du cou.

2° Sur la ligne médiane, au-devant de la trachée, inciser longitudinalement la peau sur une étendue de quelques centimètres.

3° Couper sur la sonde cannelée l'aponévrose qui réunit les deux sterno-mastoïdiens.

4° Décoller au long de la trachée le tissu cellulaire en s'aidant du

bec de la sonde; écarter en dehors le sterno-mastoïdien : on aperçoit le paquet vasculo-nerveux.

5° Avec une pince et la sonde, ouvrir la gaine du paquet vasculo-

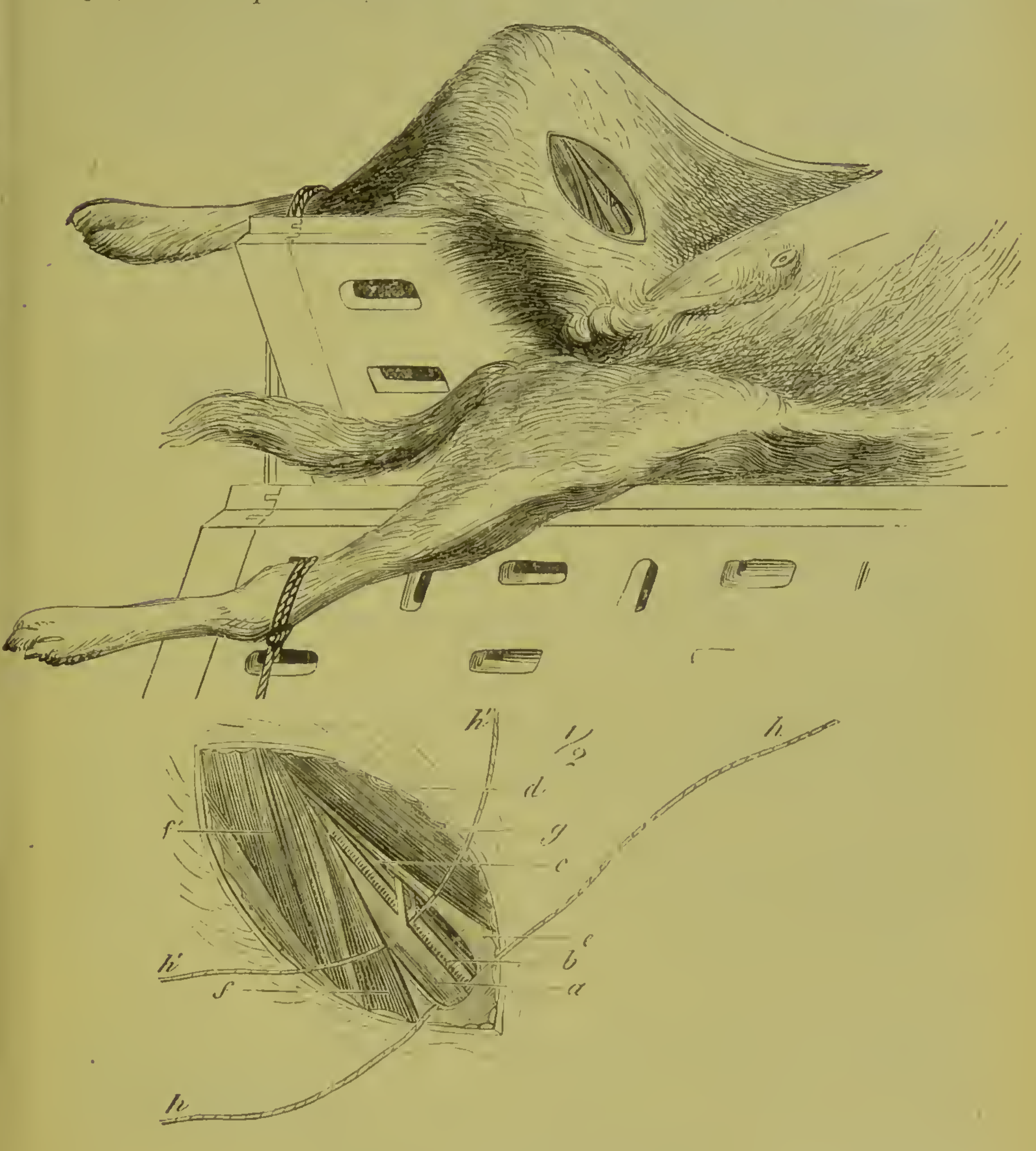


Fig. 122. — Pli de l'aine chez le chien.

nerveux, reconnaître l'artère, plus volumineuse que la veine. Pratiquer l'injection comme il a été dit plus haut.

VII. — INOCULATION INTRAPÉRITONÉALE.

A. **Substances liquides.** — Toutes les précautions possibles doivent être prises pour ne pas perforer l'intestin.

1° Fixer solidement l'animal sur le dos; raser et désinfecter quelques centimètres carrés de la peau de l'abdomen.

2° Pincer la paroi abdominale entre le pouce et l'index de la main gauche de façon à obtenir un pli comprenant la peau et les muscles.

3° Enfoncer l'aiguille de la seringue à la base du pli de manière à ce que la pointe fasse saillie au dehors, du côté opposé; ramener alors l'aiguille en arrière pour amener la pointe dans la cavité abdominale, et pousser l'injection. Retirer ensuite l'aiguille.

Le procédé suivant donne une sécurité plus grande; avec une aiguille recourbée qui n'est creuse que dans sa première moitié et dont le trou est situé à la partie la plus déclive de l'arc (fig. 123), on traverse la base du pli de la paroi abdominale; la pointe faisant saillie au dehors, le trou se trouve dans la cavité péritonéale; on pousse alors l'injection. La pointe de l'aiguille, restant au dehors pendant toute la durée de l'injection, ne peut blesser l'intestin.



Fig. 123. — Aiguille pour inoculation dans le péritoine.

B. **Substances solides.** — 1° L'animal est fixé sur le dos, la peau de la région rasée et aseptisée.

2° Pratiquer sur la ligne blanche une incision de la peau, incision dont la longueur varie avec la taille du corps à inoculer.

3° Couper l'aponévrose au niveau de la ligne blanche en s'aidant de la sonde cannelée pour ne pas léser l'intestin.

4° Saisir chaque lèvre de l'aponévrose avec une pince à forcipressure et l'attirer en haut autant que possible pour s'opposer à la hernie de l'intestin; introduire dans la plaie le corps à inoculer et le faire pénétrer dans la cavité péritonéale en l'engageant latéralement sous la paroi musculaire.

5° Suturer l'aponévrose à la soie, puis suturer la peau et recouvrir la plaie avec du collodion.

Remarque. — La plus grande asepsie est nécessaire dans la pratique des inoculations intrapéritonéales; ces inoculations seront toujours faites avec un produit pur; si l'on injectait dans le péritoine des crachats, matières fécales, etc., l'animal succomberait rapidement à une péritonite banale.

C. **Sacs de collodion.** — Dans leurs recherches sur la toxine cholérique, Metchnikoff, Roux et Salimbeni ont imaginé de cultiver les microbes dans de petits sacs de collodion fermés et inclus dans le péritoine des animaux. Par ce procédé on cultive les microbes à l'abri des phagocytes. La mince paroi de collodion s'oppose au passage des cellules (microbes et phagocytes), mais permet les échanges osmotiques qui modifient la composition du milieu de culture dans

les sacs et laissent diffuers dans l'organisme animal les toxines sécrétées par les microbes. Ce procédé a reçu de nombreuses applications en technique bactériologique.

a. *Préparation des sacs.* — Avoir à sa disposition : du collodion non riciné dans un flacon à large ouverture, de petits tubes de verre de 5 à 6 millimètres de diamètre intérieur, de petits bouchons coniques en caoutchouc, un tube à essai bien calibré et sans renflement à sa partie inférieure, du fil de soie.

1° A la surface inclinée du collodion promener l'extrémité inférieure du tube à essai en lui imprimant un mouvement de rotation régulier.

2° Retirer le tube du contact du collodion, continuer à le tourner entre les doigts pendant environ une minute.

3° Plonger dans de l'eau, pendant une minute, le tube recouvert de collodion. Le sortir de l'eau, polir avec les doigts la surface du collodion, replonger dans l'eau pendant plusieurs minutes.

4° Séparer du tube le sac de collodion ; opérer lentement, commencer par dégager l'extrémité supérieure du sac avec l'ongle du pouce puis dévaginer progressivement. Distendre le sac par insufflation, le remplir d'eau ; le sac doit avoir une capacité de un à plusieurs centimètres cubes.

5° Sur l'orifice du sac, coupé perpendiculairement à l'axe, fixer un petit tube de verre par une ligature serrée à la soie. Mettre dans un flacon bouché à l'ouate les sacs ainsi préparés et les bouchons de caoutchouc. Stériliser à 115°.

6° Chaque sac est retiré du flacon avec une pince flambée et porté dans un verre stérile recouvert de papier. Aspirer l'eau du sac avec une pipette et la remplacer par un bouillon de culture ensemencé avec le microbe à étudier.

7° Fermer l'orifice du tube avec un bouchon de caoutchouc manié avec une pince flambée ; couper le bouchon au ras du tube avec un scalpel flambé. Déshydrater le bouchon à l'alcool absolu, le recouvrir de plusieurs couches de collodion.

Le sac est alors prêt pour l'inclusion dans le péritoine ; les manipulations qu'exige sa préparation sont longues et délicates et on n'arrive à obtenir un sac parfait qu'avec un peu d'habitude.

b. *Inclusion dans le péritoine.* — Se pratique chez le cobaye, le lapin, le chien, le mouton, les bovidés. Ces animaux tolèrent très bien des sacs aseptiques remplis de bouillon stérile.

Au bout d'un temps variable, quelques jours à plusieurs mois, on sacrifie l'animal, retire le sac et étudie son contenu. Quand l'inclu-

sion dure plusieurs semaines, il arrive fréquemment que l'on trouve le sac rompu, aussi doit-on opérer sur plusieurs animaux pour être sûr de retrouver un sac intact.

L'inclusion dans le péritoine se pratique comme nous l'avons exposé plus haut (B).

Roux et Nocard ont proposé de remplacer le sac de collodion par un fragment de la membrane tubulaire qui tapisse la cavité centrale du roseau ; nous n'avons aucune expérience de cette façon de faire.

VIII. — INOCULATION DANS LES VOIES BILIAIRES.

Chez tous les animaux ordinairement utilisés, la bile se déverse dans le duodénum par un seul canal, le canal cholédoque, qui s'ouvre dans l'intestin plus ou moins près du pylore ; chez le chien, l'abouchement est à 4-12 centimètres, chez le lapin, à un centimètre au-dessous du pylore, chez le cobaye, à la partie moyenne du duodénum. Nous décrirons l'opération chez le cobaye et le chien. La plus grande asepsie est de rigueur.

A. **Cobaye.** — 1° Anesthésier l'animal et le fixer sur le dos ; raser les poils, aseptiser la peau de l'abdomen.

2° Sur la ligne médiane, à un centimètre au-dessous de l'appendice xiphoïde, commencer une incision qui suit la ligne blanche sur une longueur de 6 centimètres. Inciser successivement la peau, l'aponévrose ; faire l'hémostase, sectionner le péritoine sur la sonde cannelée.

3° Reconnaître l'extrémité pylorique de l'estomac ; avec l'index rechercher et attirer au dehors le duodénum ; vers sa partie moyenne on aperçoit l'abouchement du cholédoque.

4° Reconnaître le canal, l'isoler et l'immobiliser sur un crochet mousse ; y faire pénétrer très obliquement, suivant son axe, la pointe d'une fine aiguille coudée à angle droit, et pousser l'injection.

5° Retirer l'aiguille, toucher avec un tampon imbibé d'eau phéniquée le point de pénétration dans le canal ; suturer à la soie l'aponévrose ; suturer et collodionner la peau.

B. **Chien.** — 1° Anesthésier l'animal, le fixer sur le dos ; raser les poils, aseptiser la peau de l'abdomen.

2° Sur la ligne blanche, à quelques centimètres de l'appendice xiphoïde, on commence une incision longitudinale de 8 centimètres environ de longueur. Inciser successivement la peau, le plan aponévrotique ; faire l'hémostase. Sectionner le péritoine sur la sonde cannelée.

3° Le doigt indicateur porté dans la plaie suit la face inférieure

du foie et se recourbe pour accrocher le duodénum qu'il amène au dehors et à gauche.

4° Reconnaître la face droite du duodénum, la suivre avec le doigt jusqu'à la rencontre d'un cordon qui, entre autres éléments (veine porte, artère hépatique, nerfs), renferme le canal cholédoque. Le canal occupe dans le cordon une position superficielle, on reconnaît son aspect nacré, sa consistance, sa direction, son abouchement à 4-12 centimètres au-dessous du pylore.

5° Isoler le canal sur une petite étendue, l'immobiliser sur un crochet mousse, y faire pénétrer suivant son axe et très obliquement l'aiguille coudée; pousser l'injection; terminer comme plus haut.

IX. — INOCULATION DANS LA VEINE PORTE.

L'opération est plus aisée chez le chien; on peut également la mener à bien, avec quelques difficultés, chez le cobaye et chez le lapin. Les parois de la veine sont très minces et faciles à déchirer. La technique que nous indiquons pour la recherche des voies biliaires conduit également sur la veine porte chez le chien; il est préférable d'opérer comme il suit:

1° Anesthésier l'animal, le fixer sur le côté gauche. Raser et aseptiser la région opératoire.

2° Dans l'hypocondre droit, à partir de l'articulation vertébrale de la dernière côte, mener une incision oblique atteignant le bord extrême du muscle droit à la hauteur de la crête de l'os iliaque. Inciser successivement la peau et les couches musculaires, faire l'hémostase. Sectionner le péritoine sur la sonde cannelée.

3° Les doigts d'un aide, engagés dans la plaie, réclinent fortement à gauche le paquet intestinal et le maintiennent dans l'abdomen.

4° A la partie supérieure de la plaie, dans la profondeur, au-dessous du foie, on reconnaît l'anse du duodénum, au niveau de laquelle se trouvent les veines mésaraïques principales qui convergent en haut vers la veine porte.

5° Reconnaître la veine, l'isoler, la fixer, y pénétrer avec l'aiguille coudée, pousser l'injection.

6° Retirer l'aiguille, toucher le point de pénétration avec un tampon imbibé d'eau phéniquée. Faire deux plans de suture; collodionner la peau.

X. — INOCULATION DANS LA CHAMBRE ANTÉRIEURE DE L'ŒIL.

A. **Substances liquides.** — 1° Fixer l'animal sur le ventre; immobiliser la tête. Il est bon d'anesthésier l'œil en y instillant quelques

gouttes d'une solution de cocaïne à 1 p. 50; au bout de dix minutes l'insensibilité est complète.

2° Écarter les paupières et fixer l'œil avec le pouce et l'index de la main gauche; enfoncer l'aiguille, perpendiculairement à l'axe de l'œil, sur le bord de la cornée, au point où celle-ci rejoint la sclérotique. Injecter quelques gouttes; retirer l'aiguille.

B. **Substances solides.** — 1° Comme en A.

2° Les paupières étant écartées et l'œil fixé, avec un très fin scalpel, un couteau à cataracte ou un couteau lancéolaire coudé, pratiquer une incision de quelques millimètres sur le bord supérieur de la cornée.

3° Faire pénétrer à travers l'incision le fragment à inoculer tenu avec une fine pince coudée, l'engager le plus possible dans la chambre antérieure par une friction légère pratiquée sur la cornée avec la curette de Daviel ou l'extrémité mousse d'un stylet.

Les inoculations dans la chambre antérieure se pratiquent ordinairement chez le lapin; elles sont employées principalement pour conférer la rage, étudier l'évolution de la tuberculose ou les phénomènes de la phagocytose.

XI. — INOCULATION DANS LES VOIES RESPIRATOIRES.

A. **Inoculation dans le poumon.**— 1° Raser et aseptiser la peau du thorax au voisinage du creux de l'aisselle.

2° Au niveau d'un des premiers espaces intercostaux, enfoncer l'aiguille perpendiculairement (de un à plusieurs centimètres suivant la taille de l'animal); pousser l'injection, retirer l'aiguille.

B. **Inoculation intratrachéale** (*mammifères*). — 1° Fixer l'animal sur le dos, la tête maintenue en extension, le cou soulevé par un tampon d'ouate serré, un gros bouchon, un petit billot, etc. Sur la partie médiane du cou, au-dessous du larynx, raser et désinfecter la peau.

2° Sur la ligne médiane du cou, au-devant de la trachée, inciser la peau sur une longueur de 2 ou 3 centimètres.

3° Inciser l'aponévrose sur la sonde cannelée.

4° La trachée étant mise à nu, y faire pénétrer l'aiguille obliquement de haut en bas entre deux anneaux et pousser l'injection. Retirer l'aiguille: toucher avec un tampon imbibé d'eau phéniquée.

Remarques. — *a.* Chez les petits animaux, il est commode, aussitôt la trachée mise à nu, de la fixer en la traversant de part en part avec un fil monté sur une aiguille à suture.

b. Si l'on veut éviter tout risque d'inoculation dans le tissu cellulaire ou dans la paroi même de la trachée, prendre les précautions suivantes : se

procurer un petit trocart très fin, muni d'une canule qui doit être plus courte que l'aiguille de la seringue; la trachée découverte, faire pénétrer le trocart entre deux anneaux, retirer le mandrin en laissant en place la canule; enfoncer l'aiguille de la seringue dans la canule de manière que la pointe de l'aiguille dépasse l'extrémité de la canule, et pousser l'injection; retirer l'aiguille d'abord, puis la canule.

5° Suturer la peau ; recouvrir la plaie avec du collodion.

C. **Inoculation intratrachéale** (*oiseaux*). — L'ouverture de la trachée se trouve en arrière de la base de la langue.

1° Ouvrir le bec, attirer en avant la langue avec une pince.

2° L'ouverture de la trachée apparaît en arrière de la langue, y injecter directement le liquide à inoculer.

D. **Inhalations, pulvérisations.**— 1° Placer l'animal dans une cage métallique à parois pleines, portant sur un des côtés une vitre permettant l'observation et munie sur une autre face de deux trous garnis d'un tampon d'ouate peu serrée pour permettre le renouvellement de l'air; par un troisième trou on fait pénétrer le tube du pulvérisateur.

2° On peut pulvériser la culture liquide à l'aide de l'appareil de Richardson, mais quand le virus est susceptible de supporter la dessiccation sans perdre de son activité, il est préférable de verser la culture liquide sur des spores de vesses-de-loup, de la poudre de lycopode, ou du charbon de bois réduit en poussière impalpable; on mélange intimement, puis on dessèche dans la cloche à vide sur l'acide sulfurique concentré. La poudre, bien sèche, est ensuite pulvérisée dans la cage à l'aide d'un soufflet.

Remarque. — Quand il opère avec des microbes pathogènes pour l'homme, l'expérimentateur doit se mettre à l'abri des poussières; l'opération devra se faire de préférence en plein air.

XII. — INOCULATION INTRACRANIENNE.

Se pratique d'ordinaire chez le lapin ou le cobaye.

A. — 1° Fixer l'animal sur le ventre, un aide maintenant solidement la tête; il n'est pas indispensable d'anesthésier l'animal.

2° Raser et aseptiser la peau du crâne, en arrière des orbites.

3° A partir de la ligne qui joint le bord supérieur des deux orbites, pratiquer, sur la ligne médiane, une incision de 3 centimètres environ, intéressant la peau et l'aponévrose. Écarter les bords de la plaie avec un blépharostat.

4° Appliquer sur la paroi osseuse, vers le milieu de l'incision, et un peu en dehors de la ligne médiane, un petit trépan dont la couronne mesure environ 5 millimètres de diamètre.

Actionner le trépan ; dès que la couronne mord, relever l'axe pour éviter de blesser le cerveau ; s'assurer fréquemment de la profondeur à laquelle on se trouve ; quand la résistance cesse, enlever la rondelle osseuse avec une pince ou un petit élévateur.

5° La dure-mère apparaît au fond de la plaie; la traverser avec l'aiguille très obliquement pour ne pas léser le cerveau, et pousser l'injection. Il est bon d'utiliser une aiguille recourbée à angle droit vers sa partie médiane.

6° Retirer l'aiguille ; toucher la plaie avec un tampon imbibé d'eau phéniquée, suturer la peau, recouvrir la plaie de collodion.

B. — Pour injecter de petites doses de toxines dans la substance cérébrale, on peut simplifier la technique précédente.

Après avoir rasé, aseptisé et incisé la peau, on pratique, avec un foret, un petit trou dans le crâne en limitant la perforation avec un curseur pour ne pas blesser les méninges, puis on enfonce l'aiguille à la profondeur voulue, déterminée d'avance par un curseur ; on injecte la toxine, on touche la plaie avec un tampon imbibé d'eau phéniquée et place un point de suture recouvert de collodion.

XIII. — *INOCULATION DANS LES VOIES DIGESTIVES.*

A. **Ingestion.** — *a.* Le procédé le plus simple consiste à mélanger la culture du microbe à inoculer à la nourriture des animaux : à du son pour le lapin et le cobaye, à une pâtée pour le chien.

b. On peut encore, pour les petits animaux, aspirer la culture dans une pipette de Pasteur à effilure courte et forte, introduire l'extrémité de la pipette dans la bouche de l'animal, puis y laisser tomber le liquide goutte à goutte en maintenant la tête élevée.

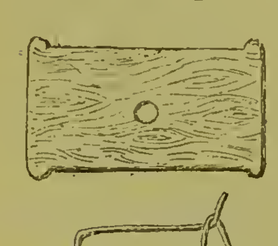


Fig. 124. — Bâillons pour le cathétérisme de l'œsophage chez le lapin et le cobaye.

c. Chez les oiseaux, faire de petites boulettes avec de la farine et la culture à inoculer, pousser ces boulettes sur la base de la langue, puis refermer le bec ; la déglutition se fait facilement.

B. **Cathétérisme de l'œsophage.** — Ce procédé est plus sûr et permet de mesurer exactement les quantités de liquide injectées.

Cobaye et lapin. — L'animal est maintenu par un aide, la tête en extension modérée ; en pressant sur les joues, au niveau des molaires, on ouvre la bouche et on place entre les mâchoires, en arrière des incisives, un petit bâillon de bois percé d'un trou central ou mieux un simple rectangle de fil

de fer (fig. 124). On introduit alors facilement par le trou du bâillon une très fine sonde urétrale en gomme jusque dans l'estomac; adapter l'aiguille de la seringue sur l'orifice de la sonde et pousser l'injection.

Chien. — Fixer l'animal sur le dos, lui placer le bâillon décrit page 165; faire pénétrer dans l'estomac une sonde œsophagienne de petit calibre ou un simple tube de caoutchouc un peu rigide et de la grosseur d'un porte-plume ordinaire. Injecter la culture par la sonde.

Il est souvent nécessaire d'alcaliniser préalablement le contenu stomacal ; pour cela on injecte avant la culture 1 ou 2 grammes de bicarbonate de soude dissous dans un peu d'eau.

C. **Injection dans l'intestin.** — 1° Pratiquer l'ouverture de l'abdomen comme il a été dit page 182.

2° Avec une pince, attirer et fixer une anse intestinale.

3° Traverser obliquement la paroi de cette anse avec l'aiguille de la seringue, pousser l'injection ; retirer rapidement l'aiguille.

4° Toucher l'anse intestinale avec un tampon imbibé de solution phéniquée; suturer l'aponévrose, puis la peau. Panser avec du collodion.

D. **Injection rectale.** — L'animal étant solidement fixé par un aide, pousser l'injection dans le rectum avec la seringue munie d'une aiguille forte à extrémité mousse.

CHAPITRE XI

OBSERVATION DES ANIMAUX INOCULÉS PRÉLÈVEMENT DES PRODUITS PATHOLOGIQUES

ARTICLE I. — OBSERVATIONS.

Quand on étudie une maladie expérimentale, on doit observer et noter chaque jour les symptômes que présente l'animal inoculé.

L'observation portera sur les points suivants :

1° **Lésion locale.** — Son existence ou son absence. Date de son apparition. Son siège, son étendue, sa nature, son évolution. Présence de ganglions.

2° **Température.** — Doit être prise dans le rectum, au moins deux fois par jour, à l'aide d'un thermomètre gradué en dixièmes de degré et de taille appropriée à chaque espèce animale. Il faut savoir que la température centrale varie chez les différentes espèces animales (la température normale du cobaye et du lapin oscille entre 38° et 39°) et avoir toujours soin de prendre la température avant l'inoculation. Chez les petits animaux, l'immobilisation complète amène rapidement un abaissement notable de la température centrale : on ne doit jamais placer le thermomètre sur un animal lié sur la table à opérations. Établir une courbe de la température.

3° **Poids.** — L'animal doit toujours être pesé avant d'être mis en expérience : on établira ainsi une relation entre le poids de l'animal et la quantité de virus qu'il est nécessaire d'inoculer pour produire un état morbide ou entraîner la mort. Dans les maladies chroniques, l'animal sera pesé périodiquement : la courbe du poids fournit de précieux renseignements sur l'évolution de l'infection.

4° **Auscultation.** — Permet de reconnaître et de suivre l'évolution des lésions pulmonaires.

5° **État du tube digestif.** — Existe-t-il de l'inappétence, de la diarrhée, etc. ?

6° **Urines.** — Contiennent-elles du sang, du pus, de l'albumine, etc. ?

7° **Habitus extérieur.** — État de la fourrure : poil hérissé, sale, etc. L'animal est-il gai, alerte ou triste, immobile ; est-il couché sur le flanc, affaissé sur l'abdomen, pelotonné en boule? Existe-t-il des paralysies, des contractures, des convulsions?

L'observation clinique sera complétée par la recherche des microbes dans les tissus, les tumeurs, les exsudats.

Article II. — PRÉLÈVEMENT DES HUMEURS, TISSUS ET EXSUDATS.

§ 1er. — POILS.

HOMME ET ANIMAUX.

Avec une pince flambée arracher quelques poils et les déposer sur une lame de verre stérilisée. En recouvrant ces poils avec une autre lame stérile et en enveloppant le tout dans un morceau de papier, on peut les conserver et les transporter purement.

§ 2. — PEAU.

HOMME ET ANIMAUX.

1° Couper les poils de la région sur laquelle on doit opérer.

2° Laver la région avec une brosse à ongles et de l'alcoolé de savon ; rincer à l'eau bouillie ; frotter énergiquement avec un tampon d'ouate imbibé de sublimé acide au millième ; rincer à l'alcool absolu, puis à l'éther ; essuyer rapidement avec du papier stérilisé.

3° Avec une pince stérilisée faire un petit pli de la peau et sectionner ce pli à sa base à l'aide d'un bistouri bien effilé et stérilisé. Si la peau est adhérente aux tissus profonds ou épaisse, il est difficile d'y produire un pli de petites dimensions ; on dessine alors un petit lambeau rectangulaire à l'aide du bistouri ; on libère un angle du lambeau, puis on le soulève avec la pince et on détache facilement, au bistouri, le fragment de peau des tissus profonds.

4° Si l'opération a été pratiquée au lit du malade, on transporte le fragment de peau au laboratoire entre deux verres de montre flambés ou dans un verre stérilisé et recouvert de papier.

§ 3. — CRACHATS.

HOMME.

A. — Pour les recherches microscopiques usuelles (bacille de Koch, etc.), il suffit de faire cracher le malade dans un flacon ou un

mouchoir propres et de pratiquer l'examen le plus tôt possible.

B. **Procédé de Kitasato.** — Doit être employé quand on veut ensemencer les crachats ou se livrer à des recherches exigeant une grande rigueur.

1° Le malade se rince plusieurs fois la bouche et l'arrière-gorge avec de l'eau bouillie, puis il crache dans une boite de Petri stérilisée.

2° Immédiatement le crachat est porté et agité dans un tube contenant plusieurs centimètres cubes d'eau stérile. Retiré du liquide avec une öse ou une pince flambée, le crachat est reporté dans un nouveau tube d'eau stérilisée. Pratiquer ainsi trois ou quatre lavages successifs. Ces lavages débarrassent de toute impureté la surface du crachat ; ils ne peuvent être effectués que sur des crachats pelotonnés, cohérents, tels que ceux de la grippe, de la tuberculose avancée (crachats nummulaires), etc.

3° Après les lavages, le crachat est placé dans une boite de Petri stérilisée et avec de fins ciseaux ou une öse flambés on en détache un petit fragment, pris au centre autant que possible, et qui servira à pratiquer les ensemencements.

§ 4. — SANG.

HOMME.

A. **Piqûre de la peau.** — Le procédé le plus simple pour se procurer une petite quantité de sang consiste à piquer la pulpe du doigt et à recueillir les gouttelettes avec une pipette Pasteur ou sur une lame ou dans un petit tube flambés. Mais ce procédé expose à des contaminations et n'est recommandable que lorsque le sang doit être examiné immédiatement au microscope (recherche du Bacille du charbon, des hématozoaires, etc.). Pour la pratique des ensemencements, il est préférable de prélever le sang dans une veine.

1° Laver la pulpe d'un doigt avec l'alcoolé de savon et la brosse, le sublimé, l'alcool et l'éther ; sécher avec du papier stérilisé.

2° Comprimer la base du doigt en la serrant avec la main gauche ou en y appliquant un lien circulaire.

3° Avec une épingle ou une lancette flambées, piquer la peau rapidement et profondément.

4° Essuyer avec un papier stérilisé la première goutte de sang qui sort de la piqûre, recueillir les suivantes.

Pour plus de sécurité, on peut, après avoir lavé et essuyé la peau, recouvrir la place où portera la piqûre avec une très légère couche

de collodion : on enfonce la lancette au centre du collodion : de cette façon on évite tout contact entre le sang et la peau.

B. **Procédé de la ventouse.** — Ce procédé présente les inconvénients du précédent, mais permet d'obtenir une grande quantité de sang.

1° Aseptiser comme de coutume la peau du thorax, du dos ou des flancs sur une étendue d'environ un décimètre carré.

2° Sur cette place, appliquer une ventouse stérilisée.

3° Quand la ventouse a pris, l'enlever (les mains de l'opérateur doivent avoir été aseptisées), scarifier avec un rasoir flambé, puis appliquer de nouveau une ventouse stérilisée.

4° Quand on a recueilli dans la ventouse une quantité suffisante de sang, détacher celle-ci en faisant placer le malade de telle sorte que le sang ne puisse se répandre. Recouvrir immédiatement la ventouse avec un papier stérilisé.

C. **Prise dans une veine du pli du coude.** — *Procédé de choix.* — Ce procédé, inoffensif, moins douloureux que les précédents et permettant d'éviter toute contamination, est le seul recommandable quand le sang doit servir à pratiquer des ensemencements.

1° Préparer une seringue stérilisable, de 2 à 20 centimètres cubes selon la quantité de sang nécessaire, munie d'une aiguille bien perméable et bien acérée; s'assurer du parfait fonctionnement de l'instrument. Stériliser la seringue et l'aiguille réunies, par immersion de quinze minutes dans l'eau bouillante.

2° L'avant-bras du patient étant étendu sur le lit, le long du corps, faire comprimer par un aide ou serrer avec un tour de bande la partie moyenne du bras comme dans l'opération de la saignée.

3° Laver la peau du pli du coude à l'alcoolé de savon, sublimé acide alcool et éther. Sous l'influence de la compression et des frictions les veines du pli du coude deviennent turgescentes.

Pour se mettre à l'abri de toute contamination, on conseille parfois d'appliquer une légère pointe de feu au niveau du point où pénétrera l'aiguille; les lavages pratiqués comme nous l'indiquons suffisent dans la grande majorité des cas.

4° Choisir la veine la plus volumineuse; traverser la peau, puis la paroi veineuse avec l'aiguille de la seringue. La veine située immédiatement sous la peau est d'ordinaire pénétrée en même temps que celle-ci. L'aiguille doit être enfoncée parallèlement à l'axe de la veine et à angle très aigu par rapport à la surface de la peau. Dès qu'on a pénétré dans la veine, en élevant légèrement le piston on voit le sang monter dans la seringue.

Remarques. — Il est inutile de s'attacher à enfoncer l'aiguille en la dirigeant vers l'extrémité du membre : il est souvent plus aisé de la diriger au contraire vers le bras ; le calibre de la veine est tel que le sang n'en afflue pas moins très facilement dans la seringue.

Ce procédé doit être employé à l'exclusion absolue de celui qui consiste à pratiquer d'abord une incision de la peau, puis à faire pénétrer directement l'aiguille dans la veine mise à nu.

5° La seringue étant remplie, retirer l'aiguille de la veine, faire cesser la compression et appliquer un peu de collodion sur la piqûre. Avoir soin de ne pas laisser le sang se coaguler dans la seringue : le chasser immédiatement dans un tube à essai stérilisé ; laver la seringue à l'eau froide, puis la stériliser.

CHEVAL, ANE, BOVIDÉS.

Opérer sur la jugulaire, comme il a été dit à propos de la préparation du sérum (p. 50). Quand on veut recueillir une petite quantité de sang, on substitue au trocart de Nocard une seringue de Debove.

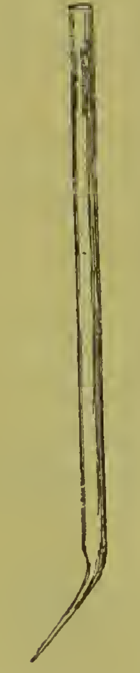


Fig. 125. — Pipette pour recueillir du sang dans la veine auriculaire du lapin.

LAPIN.

A. **Veines de l'oreille.** — Le procédé le plus simple consiste à prélever le sang dans une veine de l'oreille ; on peut ainsi obtenir facilement 20 centimètres cubes de sang chez un lapin adulte.

1° L'animal est maintenu sur les genoux d'un aide ou sur ceux de l'opérateur ; l'oreille est saisie et lavée comme d'ordinaire, après que les poils en ont été coupés sur le trajet de la veine marginale (Voy. p. 178). Une pince à pression est posée sur la racine de l'oreille.

2° On a préparé d'avance une pipette Pasteur de grandes dimensions dont l'effilure forte et courte est coudée à angle obtus (fig. 125) ; l'extrémité de l'effilure est aiguë et les bords en sont maintenus tranchants. La pipette ainsi préparée est stérilisée dans la flamme du bec Bunsen, puis laissée refroidir. Cet instrument est préférable, dans le cas actuel, à la seringue.

3° L'oreille étant tendue avec la main gauche, on enfonce la pointe de la pipette à travers la peau, puis à travers la paroi veineuse ; dès que celle-ci est traversée, le sang monte dans la pipette. Il faut pénétrer bien parallèlement à l'axe de la veine pour

ne pas être exposé à traverser les deux parois du vaisseau : la pointe de la pipette est toujours dirigée vers l'extrémité, et non vers la racine de l'oreille.

Le sang monte lentement dans la pipette ; s'il s'arrêtait, c'est qu'un petit caillot se serait formé au niveau de l'effilure ; on déplace facilement ce caillot en pratiquant une aspiration légère par l'extrémité bouchée à l'ouate de la pipette.

Il est bon de piquer d'abord la veine très près de la racine de l'oreille ; en cas d'insuccès de l'opération, on recommencerait en pratiquant la piqûre un peu plus bas, vers l'extrémité de l'oreille. En utilisant successivement les veines des deux oreilles on peut pratiquer, à intervalles plus ou moins rapprochés, un très grand nombre de prélèvements de sang sur un même animal.

4° Le sang recueilli, retirer la pipette et en fermer la pointe à la lampe. Le sang peut ensuite être aspiré dans des pipettes Pasteur par l'extrémité bouchée à l'ouate du tube qui a servi au prélèvement ; flamber très fortement le bouchon d'ouate avant de le retirer.

5° Placer un instant la pince à pression sur la piqûre de l'oreille pour arrêter l'écoulement de sang. Après l'opération l'animal présente une soif vive ; on doit laisser de l'eau à sa disposition.



Fig. 126. — Veine jugulaire du lapin, direction de l'incision (*a*, *b*) par laquelle on arrive sur cette veine (Claude Bernard).

B. **Veine jugulaire.** — Mêmes données anatomiques que pour le cobaye (Voy. p. 179).

1° Fixer l'animal sur le dos, maintenir la tête en extension, raser

la peau de la face antérieure du cou et la désinfecter comme de coutume.

2° Sur le milieu de la ligne de direction de la veine (fig. 126) inciser la peau et le peaussier, écarter le tissu cellulaire avec le bec de la sonde cannelée : la veine apparaît dans la plaie.

3° Pénétrer très obliquement dans le vaisseau avec l'aiguille d'une seringue stérilisée ou la pointe de la pipette décrite plus haut ; un fil glissé sous la veine au moyen de l'aiguille de Deschamps, au-dessous de la piqûre (du côté du cœur), permettra de comprimer le vaisseau et facilitera l'accès du sang dans la pipette.

4° Le sang prélevé, retirer l'aiguille ou la pipette, s'assurer qu'il ne se produit pas d'hémorragie par la piqûre, auquel cas on placerait deux ligatures, l'une au-dessus, l'autre au-dessous de l'orifice d'entrée de l'instrument; placer sur la peau deux ou trois points de suture et recouvrir la plaie de collodion.


Fig. 127. — Trocart fin pour la jugulaire des petits animaux.

Remarque. — On peut encore faire écouler directement le sang dans un tube ou un matras stérilisés; pour cela on place dans a veine dénudée un fin trocart de Nocard (fig. 127) et on conduit l'opération comme nous l'avons dit page 50.

C. **Artères carotide et fémorale.** — 1° Mettre à découvert le vaisseau choisi (Voy. p. 180 la technique de ces opérations).

2° Piquer obliquement la paroi de l'artère avec l'aiguille, la pointe de la pipette coudée ou le petit trocart.

3° Le sang recueilli, retirer l'instrument; suturer la peau, appliquer du collodion sur la plaie.

Quelquefois une hémorragie se produit par la piqûre après que l'on a retiré l'aiguille de l'artère; pour obvier à cet accident, il est bon de placer préventivement sous le vaisseau deux fils, l'un au-dessus, l'autre au-dessous de la piqûre; si l'hémorragie se produit, lier les deux fils de manière à isoler la portion du vaisseau sur laquelle a porté le traumatisme.

COBAYE.

Opérer sur la veine jugulaire ou sur les artères fémorale ou carotide en se conformant en tous points aux indications que nous avons données pour le lapin.

CHIEN.

Pratiquer le prélèvement sur la veine saphène externe (Voy. p. 179) ou sur la veine jugulaire, les artères carotide et fémorale, en se conformant aux règles habituelles. Le sang du chien se coagule rapidement.

OISEAUX.

Opérer sur la veine axillaire (Voy. p. 180) en prenant les précautions ordinaires.

EXTRACTION DU SÉRUM.

Depuis l'extension des recherches sérothérapiques on a souvent l'occasion de recueillir du sérum chez les animaux immunisés. Pour les grands animaux, on suit la technique exposée page 49. Chez les petits animaux, on peut retirer le sang comme nous venons de le dire, en s'adressant de préférence à la carotide, et attendre la coagulation et la rétraction du caillot pour décanter le sérum. On perd ainsi une grande partie du sérum qui est retenue dans le caillot; il est préférable de recourir à l'appareil de Latapie pour petits animaux qui met à l'abri de toute contamination et assure un rendement de 80 p. 100 du sérum total.

Appareil de Latapie. — Il se compose d'un gros tube de verre B, étranglé vers son tiers inférieur et portant au-dessous de l'étranglement E, une tubulure T, ouverte et munie d'un tampon d'ouate, et une effilure coudée D, scellée à la lampe ; à la partie inférieure du tube existe une petite cupule, F. La partie supérieure du cylindre B est reliée par une bague de caoutchouc à un deuxième tube de verre, A, dit tube trocart, préparé avec un tube ordinaire à expérience, coudé et étiré à son extrémité supérieure et s'enfonçant profondément dans le tube B par son extrémité inférieure ouverte. Enfin, au centre de l'appareil se trouve une tige creuse de verre, de petit diamètre, H, fermée à une de ses extrémités et portant de nombreuses ouvertures sur ses parois.

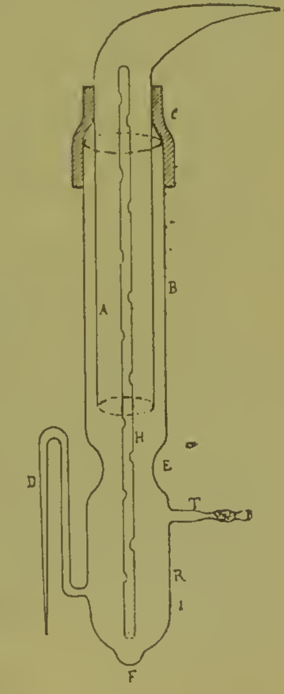


Fig. 128.

Opération. — Après avoir placé quelques gouttes d'eau dans l'appareil, on le porte à l'autoclave et on le stérilise à 120°. Il est alors prêt à servir. La carotide étant découverte selon les règles ordinaires, on casse la pointe du tube A avec une pince flambée et on en introduit la partie effilée dans le vaisseau, le tube A étant, bien entendu, placé en bas. Le sang monte dans l'appareil ; on arrête la saignée avant que le tube A ne soit rempli, on ferme l'effilure à la lampe en ayant soin d'aspirer légèrement en T pour que le sang ne coule pas pendant la fermeture, puis on laisse reposer

l'appareil, le tube trocart en bas. Le caillot se forme autour de la tige H et se rétracte autour d'elle en abandonnant les parois du tube A ; on n'a plus alors qu'à retourner l'appareil, le sérum tombe dans le réservoir-pipette B, les globules rouges se collectent dans la cupule F. En quelques heures on peut ainsi recueillir 80 p. 100 du sérum que l'on fait écouler facilement par l'effilure D, quand, après avoir brisé sa pointe, on souffle par le tube T. — Avec un peu d'habileté et de pratique on peut, par cette méthode, saigner deux à trois fois un petit animal (lapin, cobaye, etc.) sans le tuer.

§ 5. — EXSUDATS PHARYNGIENS.

HOMME.

A. **Piqûre de l'amygdale.** — 1° Faire rincer soigneusement la bouche du malade à l'eau bouillie pour la débarrasser des mucosités.

2° Faire asseoir le malade au jour, l'engager à l'immobilité en lui exposant l'innocuité de l'opération, placer l'abaisse-langue.

3° Prendre de la main droite une pipette Pasteur un peu longue, à effilure forte et terminée par une pointe aiguë à bords tranchants, en chauffer fortement l'extrême pointe, la porter rapidement dans la bouche et l'enfoncer en plein tissu de l'amygdale. La pointe chaude cautérise la surface de la glande, détruit par conséquent les germes qui s'y trouvent et arrive pure et refroidie dans les couches profondes; aspirer légèrement par l'extrémité bouchée à l'ouate de la pipette, puis retirer l'instrument.

4° On n'obtient ainsi qu'une très faible quantité de matière; pour pratiquer l'ensemencement, on porte immédiatement l'extrémité de la pipette dans un tube de bouillon stérile et on aspire et refoule à deux ou trois reprises un peu de bouillon dans la pipette.

B. **Récolte de fausses membranes.** — Après avoir fait rincer la bouche du malade avec de l'eau bouillie, abaisser la langue et détacher la fausse membrane à l'aide d'une pince à forcipressure stérilisée. Si la fausse membrane est friable, la pince ne peut la saisir; on la détachera alors par friction à l'aide d'un petit tampon de coton stérile fixé sur les mors d'une pince.

La fausse membrane détachée est portée entre deux feuilles de papier stérilisé, entre lesquelles on la comprime légèrement pour débarrasser sa surface des impuretés qui peuvent s'y rencontrer.

§ 6. — ABCÈS.

HOMME.

1° Raser, s'il en est besoin, la surface de l'abcès; aseptiser la peau.

2° Pénétrer dans l'abcès avec une aiguille forte, aspirer le pus dans la seringue stérilisée.

3° Si le pus est trop épais pour être aspiré dans la seringue, pratiquer une petite incision de la peau ; engager dans l'incision la grosse effilure d'une pipette Pasteur et aspirer le pus dans la pipette. On peut encore, après incision, prélever du pus à l'aide d'une öse.

ANIMAUX.

1° Raser les poils et cautériser un point de la surface de l'abcès avec une tige de fer fortement chauffée.

2° Au centre de l'escarre faire pénétrer l'effilure d'une pipette Pasteur et y aspirer le pus.

§ 7. — EXSUDATS DES PLÈVRES ET POUMONS.

HOMME ET ANIMAUX.

On peut prélever aisément une petite quantité d'un épanchement pleural au moyen d'une seringue stérilisée. Il est indispensable d'utiliser une aiguille longue de 5 à 7 centimètres et à large lumière. Dans les épanchements purulents, quand le pus est épais, grumeleux, on a avantage à se servir d'un petit trocart s'adaptant à la seringue de Debove.

1° Aseptiser la peau ; pour se mettre à l'abri de toute souillure, on peut placer une pointe de feu superficielle à l'endroit où doit pénétrer l'aiguille.

2° Pénétrer dans un espace intercostal avec l'aiguille montée sur la seringue, puis aspirer le liquide dans la seringue.

3° Projeter le liquide dans un tube à essai stérilisé.

Ces ponctions, absolument inoffensives, peuvent être multipliées.

La même technique permet, quand il n'existe pas d'épanchement pleural, de ponctionner le poumon, de pénétrer, par exemple, au centre d'un foyer de pneumonie reconnu par l'auscultation ; on enfonce alors une aiguille fine perpendiculairement, plus ou moins profondément, dans l'espace intercostal, et l'aspiration amène dans la seringue un peu de liquide sanguinolent.

§ 8. — LIQUIDE D'ASCITE.

HOMME.

On peut prélever purement de grandes quantités de sérosité ascitique en employant un trocart de Nocard, muni de son ajutage

stérilisé, et en recueillant le liquide dans un bocal bouché au papier. On conduira l'opération avec les précautions ordinaires, en observant les règles de la ponction de l'abdomen chez l'homme. Rappelons que la peau doit être aseptisée avec soin.

§ 9. — TUMEURS ET GANGLIONS.

Les extirper selon les procédés chirurgicaux, en observant une asepsie rigoureuse (nettoyage de la peau, stérilisation des instruments, des mains, etc.) et en évitant de toucher avec les doigts la partie à enlever.

L'organe énucléé, cautériser un point de sa surface avec une tige de fer fortement chauffée, puis opérer le prélèvement avec une öse ou un bistouri flambés, en passant au centre de l'escarre.

§ 10. — RATE.

PONCTION DE LA RATE (homme).

Cette opération a été utilisée pour retirer le bacille d'Eberth de la rate des typhiques et dans l'étude de certaines infections.

1° S'assurer des dimensions exactes de la rate par les procédés ordinaires de percussion; aseptiser la peau.

2° Au centre de la matité splénique, enfoncer perpendiculairement à la peau une aiguille longue de 4 à 5 centimètres et reliée à la seringue de Debove par l'ajutage en caoutchouc (p. 172). Pratiquer l'aspiration, retirer l'aiguille, appliquer un peu de collodion sur la piqûre.

3° On n'obtient d'ordinaire que quelques gouttes de sang; pour pratiquer l'ensemencement, il faut aspirer du bouillon dans la seringue de manière à laver et entraîner ce sang.

L'usage de l'ajutage en caoutchouc est indispensable : il laisse à l'aiguille une certaine mobilité qui lui permet de suivre les mouvements de la rate et éloigne le danger de déchirure de cet organe.

La ponction de la rate est d'ailleurs une opération d'exception et qui n'est pas sans dangers.

ABLATION DE LA RATE (animaux).

Cette opération permet d'étudier l'influence de la rate sur les infections. Elle peut être pratiquée chez beaucoup d'animaux, mais elle est particulièrement bien supportée par le chien et le rat.

La rate occupe le flanc gauche, au niveau des dernières fausses côtes, au voisinage de la courbure gauche de l'estomac.

1° Fixer l'animal sur le flanc droit; il est bon de l'anesthésier.

2° Raser et désinfecter la peau du flanc gauche; aseptiser avec soin les instruments et les mains.

3° Immédiatement au-dessous du rebord de la dernière côte, à partir de l'angle de cette côte et parallèlement à l'os, inciser la peau et le tissu cellulaire sur une étendue de quelques centimètres

4° Sectionner, en utilisant la sonde cannelée, l'aponévrose du grand oblique, puis le petit oblique.

5° Séparer les fibres du transverse à l'aide du bec de la sonde.

6° Inciser le péritoine d'un bout à l'autre de la plaie.

7° On aperçoit la rate, ou le doigt va la chercher au voisinage de la courbure de l'estomac; l'attirer au dehors en veillant à ce qu'elle ne se déchire pas.

8° Écarter l'épiploon qui accompagne la rate et poser une ligature solide, à la soie, sur les vaisseaux du hile; sectionner le pédicule en avant de la ligature.

9° Placer deux plans de sutures, le premier sur les muscles, le second sur la peau; recouvrir la plaie de collodion.

§ 11. — PONCTION VERTÈBRALE LOMBAIRE.

HOMME.

La ponction lombaire, imaginée par Essex Wynter, permet de recueillir du liquide céphalo-rachidien. L'étude bactériologique de ce liquide présente un grand intérêt dans les méningites.

Données anatomiques. — Chez l'adulte la moelle ne descend que jusqu'à la deuxième vertèbre lombaire; chez l'enfant d'un an, jusqu'à la troisième. On ne peut donc la blesser en pénétrant avec un fin trocart dans les troisième, quatrième ou cinquième espaces lombaires; à ce niveau flottent dans le liquide céphalo-rachidien les nerfs de la queue de cheval, réunis en deux faisceaux latéraux séparés par un intervalle de 5 millimètres. Plus on opère bas, moins on a de chance de blesser les nerfs de la queue de cheval, de moins en moins nombreux dans le canal à mesure qu'on descend.

La largeur des troisième et quatrième espaces lombaires est de 18 à 20 millimètres, leur hauteur de 10 à 15; leur forme varie suivant l'âge de l'individu; le cinquième espace, entre le dernier arc lombaire et le bord supérieur du sacrum, est un peu moins haut, mais plus large que les précédents, il correspond au cul-de-sac arachnoïdien inférieur, véritable réservoir de liquide céphalo-rachidien.

L'aiguille pénétrera d'une longueur variable suivant l'âge et l'état

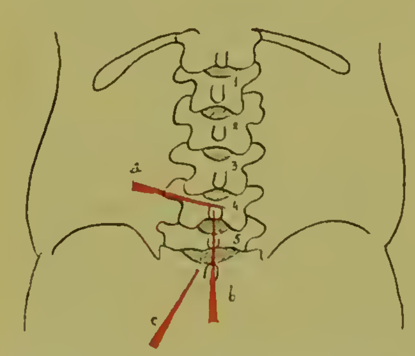
d'embonpoint du sujet; chez l'enfant on doit piquer à 1, 1 1/2, 2 et quelquefois 3 centimètres suivant l'adiposité du sujet; chez l'adulte, on pénètre de 4 à 6 centimètres. En enfonçant la pointe trop avant, on peut atteindre le plexus veineux préméningé et avoir un peu de sang, il faut alors retirer légèrement l'aiguille pour obtenir l'écoulement du liquide céphalo-rachidien.

Opération. — Règles générales. — 1° Préparer et stériliser une grosse aiguille de Pravaz, de 0,8 à 1 millimètre de diamètre, longue d'environ 5 centimètres pour l'enfant, d'environ 7 à 8 centimètres pour l'adulte; nous utilisons d'ordinaire chez l'adulte un petit trocart construit par Galante, long de 7 centimètres et de 1,1 à 1,2 millimètre de diamètre.

2° Placer le malade dans le décubitus latéral, les jambes et l'extrémité céphalique fléchies en avant. Pas d'anesthésie. Asepsie parfaite de la peau de la région et des mains de l'opérateur.

3° L'aiguille enfoncée suivant le procédé choisi (Voy. ci-dessous), laisser écouler le liquide dans un tube stérile, directement ou par l'intermédiaire d'un petit ajutage en caoutchouc stérilisé s'adaptant sur le pavillon de l'aiguille.

4° Retirer au plus 10 centimètres cubes de liquide chez l'enfant, 30 chez l'adulte; la ponction ne présente pas de danger si l'on n'évacue que ces quantités de liquide. — Enlever l'aiguille, obturer la piqûre avec du collodion iodoformé. Laisser le patient au lit pendant les vingt-quatre heures qui suivent la ponction.


Fig. 129. — Procédés de ponction lombaire, d'après Chipault. — A. Procédé de Quincke. — B. Procédé de Marfan. — C. Procédé de Chipault.

Procédé de Quincke. — Choisir le troisième ou le quatrième espace lombaire.

a. *Enfant.* — Piquer à 5 ou 10 millimètres de la ligne médiane, au milieu de l'espace compris entre deux apophyses épineuses (*a*, fig. 129). Enfoncer l'aiguille de 1 à 3 centimètres en la dirigeant vers la ligne médiane de manière à l'atteindre quand la pointe aura pénétré dans le sac dural.

b. *Adulte.* — Enfoncer de même l'aiguille (de 4 à 6 centimètres) à 10 millimètres de la ligne médiane, à la hauteur du dernier tiers ou de l'extrémité de l'apophyse qui domine l'espace.

Procédé de Marfan. — Ce procédé réussit très bien chez les jeunes enfants, à apophyses courtes et à espaces interlaminaires très hauts. Il ne paraît pas applicable aux adultes.

Ponctionner entre la troisième et la quatrième vertèbre lombaire. Une ligne horizontale tangente à la partie la plus élevée de la crête iliaque passe d'ordinaire sur l'apophyse de la quatrième vertèbre lombaire. Plonger l'aiguille immédiatement au-dessus de cette apophyse, très près de la ligne médiane, en la dirigeant un peu obliquement de bas en haut (*b*, fig. 129).

Procédé de Chipault. — Ponction lombo-sacrée, dans l'espace compris entre le cinquième arc lombaire et le bord supérieur du sacrum. Les points de repère sont beaucoup plus faciles à préciser que pour la ponction lombaire proprement dite. Nous avons eu recours à ce procédé dans cinq opérations de ponction du canal rachidien chez l'adulte.

Piquer sur le bord latéral de la première apophyse sacrée en dirigeant l'aiguille en haut et en dedans, vers la ligne médiane. L'aiguille suit le bord supérieur de la lame vertébrale sacrée, et pénètre sans difficulté dans le cinquième espace ; l'enfoncer de 1,5 à 3 centimètres chez l'enfant, de 4 à 6 chez l'adulte (*c*. fig. 129).

§ 12. — LAIT.

Opérer comme il a été dit page 34 (C).

§ 13. — MATIÈRES FÉCALES.

Les matières sont recueillies dans un vase rincé à l'eau bouillante; éviter avec soin le mélange d'urine.

Quand les matières sont solides, on en cautérise la surface avec une tige de fer rougie et on effectue le prélèvement au centre avec une öse ; les fèces liquides sont puisées avec une pipette Pasteur.

§ 14. — URINES.

HOMME ET GRANDS ANIMAUX.

Suivre la technique exposée page 35.

PETITS ANIMAUX (lapin, cobaye, etc.).

Chez ces animaux l'introduction de la sonde étant impossible, on recueille l'urine, chez le mâle, au moment où elle sort de l'urètre, à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'un tube à essai stérilisés. Pour cela, il est indispensable de fixer l'animal sur le dos; on provoque aisément l'émission d'urine en entourant l'abdomen et les lombes de l'animal avec un linge imbibé d'eau très froide.

CHAPITRE XII

TECHNIQUE DES AUTOPSIES

Les autopsies microbiologiques ont pour but : 1° de faire connaître la nature des lésions qui ont entraîné la mort de l'animal d'expérience; 2° de permettre de recueillir purement le sang, les humeurs, les pulpes d'organes, où doivent être recherchés les microbes (par l'examen microscopique, les cultures, les inoculations), et de prélever des fragments d'organes devant servir à la confection des coupes. En pratiquant une autopsie, on observera les règles suivantes :

A. — Éviter de souiller la table, les objets environnants avec les produits provenant du cadavre; celui-ci sera toujours placé sur un plateau en zinc; tout instrument ayant servi ne sera plus déposé sur la table, mais sur le plateau, jusqu'à la fin de l'opération.

B. — Les mains de l'opérateur n'entreront jamais en contact direct avec le cadavre ; la peau, les plans musculaires, les différents organes seront soulevés et maintenus à l'aide de pinces à dissection.

C. — Les instruments utilisés pour l'autopsie doivent être préalablement stérilisés pour qu'ils n'apportent aucune souillure aux organes avec lesquels ils entrent en contact.

D. — Les autopsies doivent être pratiquées aussitôt après la mort de l'animal.

E. — L'autopsie terminée, le cadavre, le papier, l'ouate qui ont été utilisés sont détruits par le feu ; les instruments sont soumis à l'ébullition ; le plateau à autopsie est plongé également dans l'eau bouillante, si ses dimensions le permettent ; en cas contraire il est lavé avec soin avec une solution forte de crésyl ou de phénol.

§ 1er. — INSTRUMENTATION.

Avant de pratiquer l'autopsie il faut préparer et tenir à portée de la main les instruments suivants :

1° Des scalpels et bistouris, des pinces à dissection, des ciseaux gros et fins, préalablement stérilisés par ébullition ;

2° Des pipettes Pasteur stérilisées ;

3° Des öses de platine dont une forte, écrasée en spatule ;

4° Une tige de fer longue de 15 à 20 centimètres, de la grosseur d'une forte plume d'oie et montée sur un manche en bois ;

5° Un plateau à autopsie en zinc (fig. 108), et, en plus, pour les petits animaux, une planchette de liège de 10 millimètres environ d'épaisseur ;

6° De l'ouate hydrophile stérile dans un flacon en verre bouché par un tampon de coton, et du papier stérile ;

Pour stériliser le papier filtre on en découpe des morceaux d'environ 10 centimètres carrés ; plusieurs de ces morceaux sont enveloppés dans une feuille de papier et stérilisés au four à flamber.

7° Une cuvette émaillée ou un cristallisoir de verre contenant une solution de sublimé ou d'oxycyanure de mercure au millième ;

8° Une lampe à alcool ou un bec de Bunsen ;

9° Des tubes de bouillon, gélose, etc. ;

10° Des flacons à large ouverture, de 30 à 50 centimètres cubes de capacité, et bouchés à l'émeri.

§ 2. — PRÉCAUTIONS PRÉLIMINAIRES.

1° Le cadavre à autopsier doit être fixé solidement. Les animaux tels que lapins, cobayes, chats, etc., sont couchés sur le dos dans le plateau à autopsie et maintenus par quatre liens noués autour des pattes (nœud coulant) et fixés dans l'un des trous du plateau.

Les petits animaux, tels que grenouilles, souris, moineaux, sont fixés à l'aide d'épingles sur la planchette de liège, le ventre en l'air, une épingle fixant le cou, quatre autres maintenant les pattes ou les ailes en extension.

Pour les pigeons et les poules, on coupe les ailes, on couche l'animal, le ventre en l'air, sur le plateau en zinc, le cou est enserré par un lien fixé dans un trou du plateau, chaque patte est fixée de même.

2° Avant l'ouverture du cadavre, il faut couper avec soin les poils sur toutes les parties où porteront les sections. Éviter de couper les poils à sec pour qu'ils ne se répandent pas dans le laboratoire : l'animal étant fixé, on mouille les poils de la face antérieure du thorax et de l'abdomen avec un tampon d'ouate imbibé de sublimé, puis on les coupe avec des ciseaux courbes ; les poils détachés sont immédiatement réunis dans un morceau de papier qui sera détruit par le feu. Pour les oiseaux, on arrache avec les mêmes précautions les plumes de la partie ventrale du corps.

§ 3. — EXAMEN EXTÉRIEUR DU CADAVRE.

Avant de pratiquer l'ouverture, on doit rechercher si le cadavre ne présente pas de lésions du tégument, d'abcès, etc. ; si l'on doit recueillir le pus d'un abcès, après avoir coupé les poils à son niveau, on cautérise fortement la peau avec la baguette de fer rougie dans la flamme; immédiatement, on flambe et casse la pointe d'une pipette Pasteur, on en introduit l'effilure dans l'abcès, au centre de l'espace cautérisé, et en aspirant par l'extrémité bouchée à l'ouate on fait monter le pus dans la pipette.

Certains animaux, tels que le lapin, font un pus épais, concret, non susceptible d'être aspiré dans la pipette; dans ce cas, après cautérisation de la peau on pratique une incision avec un bistouri fortement flambé et on puise directement dans l'abcès, soit avec la pointe du bistouri, soit avec une öse forte. Avec le pus ainsi prélevé on ensemence directement les tubes de culture et on prépare des lamelles comme nous le verrons plus loin.

§ 4. — OUVERTURE DU CADAVRE.

On commencera toujours l'autopsie par l'ouverture du thorax ; en ouvrant d'abord l'abdomen on s'exposerait à souiller irrémédiablement les organes thoraciques.

A. **Mammifères.** — 1° Soulever la peau avec une pince au niveau de la fourchette sternale, l'inciser à ce niveau avec un bistouri, puis prolonger l'incision, qui n'intéresse que le tégument, jusqu'à la partie inférieure de l'abdomen; libérer la peau par une petite incision sur la racine de chaque membre, la disséquer et rejeter de chaque côté les deux lambeaux obtenus.

2° A ce moment, si on soupçonne un épanchement pleural, cautériser la paroi musculaire dans un espace intercostal, enfoncer la pointe flambée d'une pipette au centre de l'escarre, aspirer un peu du liquide (ensemencer et préparer des lamelles).

3° Pour ouvrir le thorax, saisir avec une forte pince l'appendice xiphoïde du sternum, l'attirer en haut, engager un peu en dehors, sous les cartilages costaux, la pointe de forts ciseaux, sectionner ces cartilages en se portant progressivement en dehors, jusqu'à la clavicule, couper cet os lui-même ; reporter les ciseaux de l'autre côté du sternum et opérer de même; on délimite ainsi un plastron qu'on rabat en haut et qu'on détache complètement au besoin.

4° Le cœur et les poumons étant mis à nu, s'il existe un épan-

chement dans le péricarde, on saisit la séreuse avec une pince flambée et tout près de la pince on enfonce dans le péricarde la pointe, fortement chauffée, d'une pipette Pasteur : on cautérise ainsi la membrane au moment même où on la pénètre et on évite toute chance de contamination; aspirer alors le liquide péricardique.

5° Pour arriver au cœur, déchirer le péricarde entre deux pinces ou l'inciser avec une pince et des ciseaux fins ; cautériser la surface du cœur au niveau d'un ventricule, avec la tige de fer portée au rouge, enfoncer au centre de l'escarre la pointe d'une pipette, aspirer le sang dans la pipette.

6° Pour recueillir du suc pulmonaire au niveau d'un point splénisé ou hépatisé, cautériser la surface du poumon avec la tige de fer, puis y enfoncer la pointe d'une pipette ou l'extrémité recourbée d'une forte öse de platine. On pourrait encore déchirer la surface du poumon entre deux pinces stériles et pénétrer directement par la déchirure avec un instrument flambé.

7° Les opérations terminées du côté du thorax, on passe à l'ouverture de l'abdomen.

Si l'on soupçonne un épanchement péritonéal, après avoir soulevé avec une pince la paroi musculaire, on y pratique une très petite boutonnière avec la lame fortement chauffée d'un scalpel ; par l'incision on introduit, parallèlement à la paroi et en évitant de léser l'intestin, la pointe flambée d'une pipette; on aspire le liquide en se portant vers les flancs.

Achever ensuite la section de la paroi musculaire, sur la ligne médiane, sur toute la hauteur de l'abdomen, récliner cette paroi à droite et à gauche.

8° Examiner les organes. Pour prélever de la pulpe du foie, de la rate, des reins, des ganglions, etc., cautériser la surface de ces viscères, puis faire pénétrer, par la surface cautérisée, une öse forte à extrémité recourbée en crochet, l'enfoncer dans la profondeur, la ramener à soi par quelques mouvements de latéralité; ensemencer la pulpe obtenue. Pour préparer les frottis, il suffit d'arracher un fragment de viscère avec une pince à dissection (Voy. chap. XIII). Si l'on veut examiner le contenu intestinal, cautériser la surface de l'intestin, pénétrer avec une pipette et aspirer.

Agir de même pour retirer l'urine contenue dans la vessie ; on facilite l'opération en jetant préalablement une ligature sur l'urètre.

B. **Oiseaux.** — L'incision du thorax doit être faite suivant une ligne courbe partant de la naissance du cou, embrassant le côté droit du sternum, contournant la pointe de cet os et remontant sur

le côté gauche. Pour cela, la peau étant incisée sur la ligne médiane, disséquée et réclinée à droite et à gauche, pratiquer une incision allant jusqu'à l'os, suivant la ligne indiquée, engager la pointe de forts ciseaux sous la clavicule droite, la sectionner, descendre en suivant l'incision des parties molles, libérer la pointe du sternum, remonter du côté gauche et terminer en sectionnant la clavicule; relever et détacher le plastron formé par l'os bréchet et les pectoraux.

Pour le reste, opérer comme précédemment.

C. **Moelle osseuse.** — Pour recueillir la moelle osseuse, mettre à nu un os long, le sectionner perpendiculairement à son axe avec de forts ciseaux chauffés dans la flamme et par l'orifice du canal médullaire enfoncer une pipette Pasteur ou une öse.

On peut encore, pour éviter de flamber les ciseaux, sectionner avec des ciseaux non flambés, puis cautériser la surface de section osseuse avec une tige de fer rougie, avant d'opérer le prélèvement.

D. **Autopsie des centres nerveux.** — Pour autopsier les centres nerveux, on fixe le cadavre sur le ventre sur le plateau à autopsie, les pattes étant attachées comme il a été dit plus haut.

Pratiquer une incision de la peau depuis la racine du nez jusqu'au sacrum en suivant la ligne des apophyses épineuses; libérer et écarter la peau; avec un bistouri fort, détacher les masses musculaires dans les gouttières vertébrales, de façon à mettre à nu les lames des vertèbres; opérer avec précaution au niveau de la région lombaire, pour ne pas ouvrir la cavité abdominale.

Avec une pince de Liston coudée, inciser les os du crâne sur une ligne horizontale joignant les deux arcades sourcilières; libérer de chaque côté ces arcades par une incision oblique; le frontal est alors soulevé avec un davier et dégagé à l'aide de la pince de Liston. On découvre ainsi l'encéphale; arrivé au trou occipital, le davier saisit les apophyses épineuses pendant que la pince, pénétrant alternativement à droite et à gauche dans le canal vertébral, sectionne les lames des vertèbres; on détache ainsi un chapelet formé par les parties postérieures des vertèbres unies par les ligaments dorsaux; une certaine habitude et un peu de patience sont indispensables pour ne pas léser la moelle dans cette opération.

S'il existe un épanchement méningé, on cautérise la surface des membranes et on pénètre au centre de l'escarre avec une pipette flambée où l'on aspire le liquide.

Pour prélever de la pulpe de la substance nerveuse, déchirer les méninges entre deux pinces, cautériser la surface de l'organe (cerveau, cervelet, bulbe, moelle), y enfoncer une pipette à forte

effilure où l'on fera pénétrer la pulpe par une aspiration énergique aidée de quelques mouvements communiqués à la pipette; on peut encore, après cautérisation de la surface, charger une öse de pulpe ou prélever de petits fragments avec un bistouri flambé.

E. **Autopsies humaines.** — Tout ce que nous venons de dire est applicable aux autopsies humaines : les pulpes, les liquides seront recueillis comme nous l'avons indiqué après cautérisation de la surface de l'organe.

Se souvenir que l'autopsie bactériologique, pour donner des résultats certains, doit être pratiquée dans les premières heures qui suivent la mort; les résultats obtenus quand l'autopsie a été faite dans les délais légaux (vingt-quatre heures après la mort) ne doivent être, surtout en été, acceptés qu'avec réserve ; la constatation de la présence du *Bacterium coli* dans les organes n'a, en particulier, aucune valeur, ce microbe pullulant quelquefois dans le cadavre immédiatement après la mort et même pendant l'agonie.

Remarque. — Les produits pathologiques extraits du cadavre peuvent être ensemencés de suite comme nous l'avons dit au cours de notre description, ou encore conservés dans les pipettes en ayant soin de sceller l'extrémité effilée de celles-ci sur une petite flamme. Pour retirer le contenu de la pipette ainsi fermée, on enfonce le bouchon d'ouate jusqu'au voisinage du niveau du liquide et on coupe la pipette à la hauteur de l'ouate avec le couteau à verre et une pointe de verre rougie; on peut dès lors enlever le bouchon à volonté et puiser dans la pipette comme dans un tube de culture.

§ 5. — PIÈCES DESTINÉES A LA PRÉPARATION DES COUPES.

Les fragments d'organes destinés à être coupés sont prélevés au moment même de l'autopsie.

Ces fragments doivent être de petites dimensions (10 à 15 millimètres de côté) ; ils sont détachés par une section aussi nette que possible pratiquée avec un bistouri stérile et bien effilé et immédiatement plongés dans un petit flacon bouché à l'émeri contenant l'un des liquides fixateurs suivants :

1° Alcool absolu.

15 à 30 centimètres cubes par fragment ; renouveler plusieurs fois le liquide pendant trois à quatre jours ; au bout de ce temps les pièces peuvent être utilisées. Les pièces peuvent être conservées longtemps dans l'alcool sans subir d'altérations.

C'est le fixateur le plus simple et le plus généralement employé on n'aura recours aux autres réactifs que dans des cas spéciaux.

2° Sublimé acide (Mayer).

Solution aqueuse saturée de sublimé (1)	100 parties.
Acide acétique cristallisable	5 —

20 à 30 centimètres cubes par fragment; la pénétration est très bonne et très rapide, les pièces immergées peuvent avoir un certain volume. Au bout de douze heures de contact, laver à l'eau courante pendant une heure et porter dans l'alcool à 70°, puis à 80°, 95° et 100° à intervalles de vingt-quatre heures; la pièce peut alors être utilisée ou conservée dans l'alcool absolu.

3° Liqueur de Flemming.

Solution aqueuse d'acide chromique à 1 p. 100	15 parties.
— — osmique à 2 p. 100	4 —
Acide acétique cristallisable	1 partie.

Doit être préparée au moment du besoin.

S'emploie comme le précédent; la pénétration est plus lente (trente-six à quarante-huit heures), mais la fixation est souvent plus satisfaisante. La liqueur de Flemming donne de bons résultats dans l'étude du système nerveux. Les fragments immergés doivent être très petits.

4° Mélange sublimé-Flemming.

Le mélange de sublimé acide et de liqueur de Flemming participe aux avantages de chacune de ces solutions. On le prépare selon la formule suivante :

Solution aqueuse saturée de sublimé	500 centimètres cubes.
— — d'acide chromique à 1 p. 10.	500 —
Acide osmique cristallisé	1 gramme.
Acide acétique cristallisable	100 centimètres cubes.

Durée d'action : vingt-quatre heures; laver ensuite et placer les pièces dans l'alcool comme il a été dit plus haut.

Dans le chapitre suivant nous traiterons de la confection et de la coloration des coupes.

(1) L'eau froide dissout environ 6,6 p. 100 de sublimé. La solution saturée s'obtient aisément en dissolvant à chaud 70 grammes de sublimé dans un litre d'eau distillée et laissant refroidir.

CHAPITRE XIII

RECHERCHE DES MICROBES DANS LES HUMEURS ET LES ORGANES

Article I. — HUMEURS ET PULPES.

L'examen des produits récoltés sur l'homme ou l'animal vivants et sur le cadavre peut être pratiqué :

1° A l'état frais, sans coloration préalable;

2° Après dessiccation et coloration.

§ 1er. — EXAMEN SANS COLORATION.

a. **Humeurs.** — Le sang, les exsudats liquides, le pus, recueillis dans une pipette Pasteur, doivent être examinés immédiatement.

Nous prendrons comme type l'examen du sang ; aussitôt que celui-ci est recueilli, on en dépose une goutte sur une lame porte-objet et on recouvre avec une lamelle; le sang s'étale entre la lame et la lamelle; en pressant légèrement sur cette dernière on fait sortir, sur les bords, l'excès de sang, excès que l'on essuie avec un linge fin ; on obtient ainsi une couche de sang très mince et uniforme dont l'examen est pratiqué immédiatement (Obj. 8 ou 9; Oc. II).

Les lames et lamelles doivent être d'une propreté extrême (Voy. p. 128), sans quoi la goutte de sang ne s'étalerait pas et l'examen deviendrait impossible; il est de toute nécessité que les hématies ne se groupent pas en piles, ce qui masquerait la présence des microbes.

Si l'examen devait être prolongé très longtemps, on pourrait luter à la paraffine les bords de la lamelle, mais, le plus fréquemment, cette précaution est inutile: la coagulation du sang au contact de l'air, sur les bords de la préparation, constituant une occlusion suffisante pour préserver les parties centrales de la dessiccation.

On opérerait de même pour les sérosités, le pus liquide, etc. ; quand le pus est concret, il est nécessaire de le traiter comme les pulpes d'organes.

b. **Pulpes d'organes.** — Les pulpes d'organes, recueillies comme nous l'avons dit (chap. XII), sont portées avec l'öse sur une lame dans une goutte d'eau filtrée ou mieux de sérum artificiel (eau 1 000, Na Cl 7, filtrer); on délaye avec l'öse, puis on recouvre avec une lamelle et on examine immédiatement (Obj. 8 ou 9; Oc. II).

§ 2. — EXAMEN APRÈS COLORATION.

Les liquides et les pulpes, avant de subir l'action des réactifs colorants, doivent être desséchés en couche mince sur une lame ou une lamelle, puis être soumis à la *fixation* qui immobilise les éléments cellulaires dans leur forme et les fait adhérer à la surface du verre.

A. — PRÉPARATION DES LAMELLES ET FROTTIS.

I. **Liquides**. — Les liquides, tels que le sang, les sérosités, le pus, sont traités de la façon suivante :

1° Déposer une goutte du liquide à examiner au centre d'une lamelle très propre tenue par un de ses angles A.



Fig. 130. — Préparation des lamelles.

2° Recouvrir de suite avec une seconde lamelle que l'on place sur la première de façon à en faire alterner les angles.

3° Saisir la seconde lamelle par l'angle B, opposé à l'angle A de la première, et séparer les deux lamelles en les faisant glisser l'une sur l'autre ; le liquide s'étale en une couche mince et uniforme.

4° Laisser sécher à l'air, ou sur une platine chauffante portée à 40°-45°, les deux lamelles ainsi préparées.

5° **Fixation**. — Il existe deux procédés de fixation.

a. *Chaleur.* — La lamelle tenue par un de ses angles avec la pince de Cornet, la face enduite regardant en haut, est passée par trois fois dans la flamme chauffante du bec Bunsen ou de la lampe à alcool. Ce procédé déforme légèrement les cellules et ne convient pas, en particulier, dans la confection des préparations de sang.

b. *Alcool-éther.* — Verser sur la lamelle deux ou trois gouttes d'alcool-éther (Voy. p. 143). Laisser sécher à l'air. Ce procédé fixe très rigoureusement les éléments cellulaires dans leur forme; il est préférable au précédent.

II. **Pulpes**. — On en prépare des *frottis* de la façon suivante :

1° Avec l'öse ou l'extrémité d'une pipette, porter sur une lame une petite quantité de la pulpe et l'y étaler par frottement en donnant au frottis la forme d'un rectangle de 15 à 20 millimètres de côté.

On peut encore prendre, avec une pince à dissection, un fragment de l'organe à examiner (rate, foie, etc.) et en frotter légèrement une partie de la surface de la lame.

Le frottis doit être mince et uniforme, sans irrégularités ni grumeaux qui gêneraient l'application de la lamelle.

2° Sécher, comme plus haut.

3° Fixer par l'alcool-éther ou par la chaleur.

Les frottis préparés avec la pulpe cérébrale ou médullaire doivent toujours, après la fixation, être lavés à plusieurs reprises avec l'alcool-éther pour les débarrasser de la matière grasse qui gênerait les colorations.

III. **Crachats**. — Quand les crachats sont fluides, on les traite comme les liquides; s'ils sont concrets, résistants, on les étale à la surface de la lamelle en se servant de l'öse; on facilite, dans ce dernier cas, la formation d'un frottis mince et régulier en chauffant légèrement la lamelle de manière à obtenir la dessiccation du crachat en même temps qu'on l'étale. Fixer après dessiccation.

B. — COLORATION.

Une lamelle, un frottis, renferment des éléments de deux sortes :

1° Un *fond*, constitué par des cellules et des éléments amorphes, d'origine animale ;

2° Des *bactéries*, cellules végétales.

On soumet les lamelles et les frottis à deux méthodes de coloration :

a. La *coloration simple*, qui colore de la même façon le fond et les microbes;

b. La *double coloration* ou *différenciation*, qui permet de conférer aux microbes une teinte différente de celle du fond.

I. — COLORATION SIMPLE.

La coloration simple d'un frottis ou d'une lamelle de sang peut être obtenue à l'aide d'une des solutions colorantes indiquées au chapitre VIII.

La solution la plus généralement employée est la *thionine phéniquée* (p. 139). On procédera de la façon suivante :

1° La lamelle étant tenue avec la pince de Cornet ou de Debrandt,

verser sur sa face enduite, de manière à la recouvrir complètement, une grosse goutte de thionine phéniquée.

Laisser en contact trente à soixante secondes.

2° Laver à l'eau distillée.

3° Porter la lamelle sur une lame, la face enduite regardant la lame. Examiner dans l'eau (Obj. 1/12; Oc. II).

4° Si la préparation est bonne et qu'on veuille la conserver, sécher la lamelle à l'air libre ou à une douce chaleur, puis monter dans le baume du Canada.

En résumé :

Colorer, laver à l'eau, sécher, monter dans le baume.

On opérerait d'une façon analogue pour la coloration des frottis sur lame. La lame étant tenue avec la main gauche ou la pince de Debrandt, verser sur le frottis une grosse goutte de solution colorante; laver à l'eau; sécher; monter en déposant une goutte de baume sur le frottis, puis en recouvrant d'une lamelle.

On peut se dispenser de recouvrir le frottis avec une lamelle. Après avoir lavé à l'eau, on sèche, puis on dépose sur le frottis une goutte d'huile de cèdre et on examine directement avec l'objectif à immersion sans interposer de lamelle.

Outre la thionine phéniquée, on emploie, dans certains cas, les violets phéniqués, les bleus de Kühne, de Löffler, de Roux, la fuchsine de Ziehl diluée, etc. En étudiant chaque microbe en particulier, nous indiquerons les solutions colorantes qui conviennent le mieux à la recherche et à l'étude des différentes espèces.



Fig. 131. — Charbon symptomatique. — Frottis de muscle. Coloration simple (fuchsine de Ziehl diluée) (Reich. Obj., 1/12 imm.; Oc. II).

La méthode de la coloration simple a l'inconvénient de donner une même teinte au fond et aux microbes (fig. 131), ce qui rend souvent ceux-ci peu visibles, surtout quand ils sont peu nombreux et que le frottis est épais. Pour remédier à cet inconvénient, on a recours aux méthodes de différenciation.

Particularités de l'examen du sang. — Dans la coloration des lamelles de sang, on peut se débarrasser du fond et éviter d'avoir

recours à la différenciation. Dans les globules rouges, l'hémoglobine seule fixe les matières colorantes : en dissolvant préalablement cette hémoglobine on a, après action de la solution colorante, un fond incolore sur lequel se détachent vigoureusement les microbes. On obtient ce résultat avec un des deux procédés suivants :

a. **Procédé de Gunther.** — 1° Déposer sur la lamelle, desséchée à une douce chaleur et non passée à la flamme, une forte goutte d'eau acétisée à 5 p. 100. Laisser en contact pendant trente secondes.

2° Exposer la lamelle pendant quelques secondes aux vapeurs d'ammoniaque.

3° Laver à l'eau.

4° Colorer, laver, sécher, monter.

b. **Procédé de Vincent.** — 1° Déposer sur la lamelle desséchée à une douce chaleur et non flambée une goutte du liquide suivant :

Solution aqueuse d'acide phénique à 5 p. 100....	6	centimètres cubes.
— — saturée de sel marin...........	30	—
Glycérine pure..............................	30	—

Laisser en contact une à deux minutes.

2° Laver à l'eau, colorer, etc.

Coloration simple. — Enfin, la coloration simple au bleu de Löffler permet d'obtenir de belles préparations de sang ; elle donne immédiatement une différenciation nette en colorant les globules rouges en vert pâle et les microbes en bleu foncé.

II. — DIFFÉRENCIATION.

La double coloration d'une préparation est aisément obtenue quand on se trouve en présence de microbes colorables par la méthode de Gram ; mais quand la bactérie à étudier ne prend pas le Gram, il faut avoir recours à des procédés plus délicats et qui donnent souvent des résultats moins satisfaisants. Enfin l'étude et la recherche de certains microbes, tels que les Bacilles de la tuberculose et de la lèpre, exigent l'emploi de méthodes de coloration spéciales dont le type est la méthode d'Ehrlich et que nous étudierons dans le chapitre consacré au Bacille de Koch.

A. **Méthode de Gram.** — La méthode décrite par Gram a subi de nombreuses modifications dont nous passerons en revue les plus importantes; mais nous tenons à mettre en garde le débutant contre les dangers qu'il y a à utiliser un trop grand nombre de procédés ; on s'expose ainsi à des erreurs et à des insuccès qui découragent vite même les plus opiniâtres ; il est indispensable de posséder à fond un procédé que l'on puisse employer en toute sécurité : nous recommandons spécialement celui que nous décrivons en *b*.

a. **Procédé de Gram.** — 1° Déposer sur la face enduite de la lame ou de la lamelle une grosse goutte de violet de gentiane aniliné (p. 140). Laisser en contact deux à quatre minutes.

2° Rejeter la solution colorante et la remplacer, sans lavage préalable, par quelques gouttes de la solution iodée de Gram. Laisser en contact une à deux minutes, jusqu'à ce que la préparation prenne une teinte noirâtre.

3° Laver à l'eau distillée.

4° Décolorer avec l'alcool absolu comme il a été dit page 145, jusqu'à obtention d'une teinte gris pâle.

5° Laver à l'eau distillée.

6° Déposer sur la préparation une forte goutte de solution aqueuse d'éosine :

Éosine soluble à l'eau.........	1 gramme.
Eau distillée.................	100 centimètres cubes.

Laisser en contact une à deux minutes.

7° Laver, sécher, monter dans le baume.

Avant le montage la préparation peut être examinée dans l'eau ; on pourra ensuite l'éclaircir, après dessiccation, par l'essence de girofles et le xylol.

Dans la préparation ainsi obtenue le fond est coloré en rose, les microbes en violet. La décoloration doit être poussée jusqu'à ce que le fond ne présente aucune teinte violette (fig. 132).

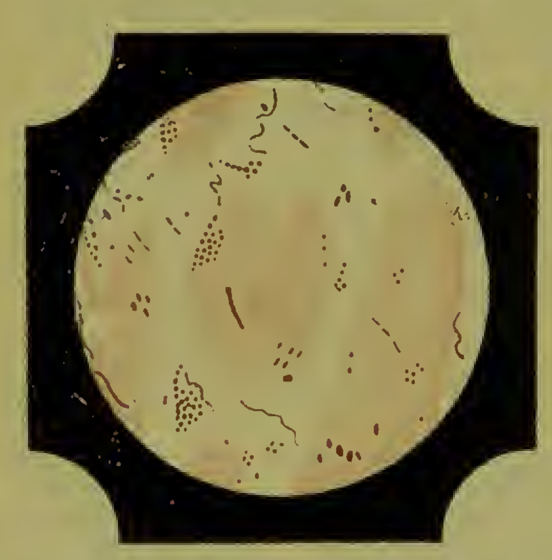


Fig. 132. — Frottis préparé avec du mucus buccal. — Bactéries diverses. — Coloration par la méthode de Gram ; fond teinté à l'éosine (Reich. Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Les lamelles de sang, traitées par la méthode de Gram, donnent de très jolies préparations. Quand on observe du sang d'oiseau, on ne laisse pas agir l'alcool jusqu'à décoloration complète du fond ; on s'arrête quand les noyaux seuls des globules rouges restent violets ; après l'action de l'éosine, le protoplasma des hématies est rose tandis que leur noyau et les microbes sont colorés en violet.

b. **Procédé recommandé.** — Nous avons insisté, au chapitre VIII, sur les inconvénients de l'emploi de la solution de violet de gentiane aniliné ; on lui préférera le krystall violet phéniqué.

1° Déposer sur la face enduite de la lame ou de la lamelle une grosse goutte de krystall violet phéniqué (p. 139). Laisser en contact trente à cinquante secondes.

2° Remplacer, sans lavage préalable, la solution colorante par la liqueur iodée de Gram ; laisser en contact une à deux minutes.

3° Laver à l'eau distillée.

4° Décolorer par l'alcool absolu.

On peut accélérer la décoloration en lavant d'abord à l'alcool absolu, puis à l'huile d'aniline et en terminant par l'alcool absolu. L'huile d'aniline est un décolorant très énergique, très brutal, et ne doit rester que quelques secondes en contact avec la préparation.

5° Laver à l'eau.

6° Colorer le fond à l'éosine aqueuse, comme plus haut.

7° Laver; sécher et monter après éclaircissement facultatif à essence de girofles et au xylol.

c. **Procédé de Nicolle.** — 1° Colorer au violet de gentiane phéniqué (p. 139) pendant dix à vingt secondes.

2° Remplacer, sans lavage préalable, la solution colorante par le liquide de Gram modifié :

Iode...........................	1 gramme.
Iodure de potassium............	2 grammes.
Eau distillée..................	200 centimètres cubes.

Laisser en contact quatre à six secondes en renouvelant une ou deux fois le liquide à la surface de la préparation.

3° Laver à l'eau distillée.

4° Décolorer par l'alcool-acétone au tiers.

Alcool absolu...........................	2 parties.
Acétone.................................	1 partie.

5° Laver à l'eau distillée.

6° Colorer rapidement le fond avec la solution alcoolique d'éosine :

Solution saturée d'éosine dans l'alcool à 95°.	1 volume.
Alcool à 95°............................	2 volumes.

7° Laver, sécher et monter dans le baume.

d. **Procédé de Mérieux.** — 1° Colorer par le violet phéniqué comme en *c*.

2° Faire agir pendant quatre à six secondes, en renouvelant une à deux fois le liquide, la solution suivante :

Iode...	1 gramme.
Iodure de potassium..........................	2 grammes.
Solution saturée d'éosine dans l'alcool à 50°.....	20 centimètres cubes.
Eau distillée................................	200 —

3° Laver à l'eau distillée.

4° Décolorer par l'alcool-acétone au sixième :

Alcool absolu	5 volumes.
Acétone	1 volume.

5° Laver, sécher et monter dans le baume.

Ce procédé ne nous a jamais donné de préparations aussi nettes que celles que nous obtenons par les procédés *a*, *b*, *c*.

c. **Procédé de Kühne.** — 1° Colorer pendant plusieurs minutes avec le bleu phéniqué (p. 139) ou le bleu ammoniacal (p. 140).

2° Laver à l'eau distillée.

3° Faire agir la solution iodée de Gram pendant deux à trois minutes.

4° Laver à l'eau distillée.

5° Décolorer avec une solution saturée de fluorescéine dans l'alcool absolu.

6° Quand la teinte bleue du fond a disparu, laver à l'alcool absolu, puis à l'essence de girofles, au xylol, et monter dans le baume.

Les bactéries apparaissent en violet sur le fond légèrement teinté par la fluorescéine.

B. **Méthode de Claudius.** — La méthode de Claudius, telle qu'elle est décrite page 146, s'applique à la coloration des frottis.

C. **Méthodes pour les microbes se décolorant par le Gram.** — α. Sang. — Pour la double coloration des lamelles de sang contenant des microbes ne prenant pas le Gram, on utilise la propriété que possèdent les hématies de fixer énergiquement l'éosine, tandis que les bactéries ont une électivité marquée pour les couleurs basiques d'aniline.

a. **Procédé recommandé** (Laveran). — 1° Déposer sur la lamelle une forte goutte de la solution aqueuse d'éosine (p. 216). Laisser en contact environ une minute.

2° Remplacer l'éosine par une solution aqueuse saturée de bleu de méthylène ; laisser agir environ trente secondes.

3° Laver à l'eau distillée.

4° Sécher ; monter dans le baume.

Les hématies sont colorées en rose ; les bactéries et les noyaux des globules blancs, en bleu. Avec le sang d'oiseau les noyaux des hématies sont également bleus.

b. **Procédé de Chenzinsky.** — 1° Déposer la lamelle, la face enduite regardant en bas, dans un petit cristallisoir à couvercle rodé contenant un peu de la solution suivante, récemment préparée :

Solution aqueuse saturée de bleu de méthylène	40 centimètres cubes.
Solution à 1/2 p. 100 d'éosine soluble à l'eau dans l'alcool à 70°	20 —
Eau distillée	40 —

Porter le cristallisoir dans l'étuve à 37°; faire durer le contact trois à six heures.

2° Au sortir du bain colorant, laver la lamelle dans l'eau distillée, sécher et monter dans le baume.

c. **Procédé de Romanowsky.** — 1° Après dessiccation et fixation dans la flamme, porter la lamelle, pendant environ une heure, dans l'étuve sèche à 105°-110°.

2° Plonger la lamelle dans le bain suivant, récemment préparé :

Solution aqueuse saturée de bleu de méthylène..............	2 parties.
— — d'éosine à 1 p. 100......................	5 —

Laisser en contact pendant une à dix heures.

3° Laver à l'eau distillée.

4° Sécher, monter dans le baume.

β. Frottis, lamelles de pus, etc. — *a*. **Procédé de Kühne.** — 1° Colorer pendant quelques minutes avec le bleu phéniqué (p. 139).

2° Laver à l'eau.

3° Laver à l'acide chlorhydrique dilué jusqu'à obtention d'une teinte bleu pâle (temps délicat, de durée variable suivant l'épaisseur du frottis).

Acide chlorhydrique dilué.

Acide chlorhydrique pur..........................	1 centimètre cube.
Eau distillée..	1 000 centimètres cubes.

4° Enlever de suite l'excès d'acide par un lavage avec la solution lithinée :

Solution aq. saturée de carbonate de lithine......	5 centimètres cubes.
Eau distillée..................................	100 —

5° Laver à grande eau.

6° Sécher; éclaircir par l'essence de girofles, le xylol et monter dans le baume.

Le fond est coloré en bleu très pâle, les microbes en bleu foncé.

b. **Procédé de Nicolle. — Procédé recommandé.** — 1° Colorer pendant quelques minutes avec le bleu phéniqué.

2° Laver à l'eau.

3° Faire agir pendant deux à trois secondes quelques gouttes de la solution suivante :

Tanin pur..............................	10 grammes.
Eau distillée............................	100 —

4° Laver à l'eau.

5° Traiter rapidement par l'alcool absolu, l'essence de girofles et le xylol; monter dans le baume.

Le fond est bleu violacé très pâle, les bacilles sont colorés en bleu foncé.

Article II. — COUPES.

La coloration des microbes dans les tissus nécessite la préparation de coupes très fines. Les coupes pratiquées à la main sont inutilisables pour les recherches bactériologiques, et l'on doit recourir aux *microtomes* mécaniques dont l'emploi exige l'*inclusion* préalable de l'objet à couper.

Les inclusions à la gomme, à la cire, au savon, à la celloïdine et au collodion, employées en histologie, ne permettent pas d'obtenir des coupes assez minces. Restent deux procédés : la congélation et l'inclusion à la paraffine.

Nous ne décrirons que ce dernier procédé, la congélation étant rarement usitée et donnant des résultats peu satisfaisants.

§ 1er. — INSTRUMENTATION.

Microtomes. — La plupart des microtomes mécaniques conviennent à la confection des coupes bactériologiques ; le modèle Rocking, construit par Dumaige, celui de Malassez, construit par Verick, ceux de Miche, de Minot, etc., sont ordinairement utilisés.

Nous n'insisterons pas sur le fonctionnement de ces divers appareils ; il suffit d'en avoir un modèle entre les mains pour se rendre compte de son mécanisme.

Rappelons que les microtomes, véritables instruments de précision, doivent être maniés avec le plus grand soin ; l'appareil sera nettoyé toutes les fois qu'on en aura fait usage et il sera conservé à l'abri des poussières et de l'humidité sous une cloche de verre ou dans une caisse en bois.

Rasoirs. — Un bon rasoir est indispensable pour la réussite des coupes. Le rasoir doit avoir une face plane (face inférieure) ; il aura assez de tranchant pour couper un cheveu maintenu entre le pouce et l'index ou un poil du dos de la main.

Avant chaque opération, le rasoir doit être passé sur le cuir (d'abord sur la face munie de pâte, puis sur la face sèche) en observant les règles ordinaires : le rasoir est repassé, le dos en avant et toujours en allant du talon vers l'extrémité de la lame ; on passe alternativement chaque face de la lame en tournant toujours sur le dos.

Il est bon également de savoir passer le rasoir sur la pierre ; on évitera aussi d'envoyer fréquemment l'instrument au coutelier et

l'on s'en trouvera beaucoup mieux. Le repassage à la pierre doit être pratiqué le tranchant en avant et en allant toujours du talon vers l'extrémité ; la pierre ne sera pas huilée, mais mouillée avec de l'eau simple ou mieux avec le liquide suivant :

Eau distillée	50	centimètres cubes.
Alcool à 95°	50	—
Glycérine	50	—

Après chaque opération le rasoir sera essuyé avec un linge fin, passé sur le cuir et replacé dans son étui.

Pour couper les objets inclus dans la paraffine, la lame du rasoir doit être sèche et aborder obliquement l'objet à couper. Les coupes sont recueillies sur le rasoir avec un fin pinceau ou un morceau de papier de soie, jamais avec un corps dur (aiguille, scalpel) qui pourrait endommager le tranchant de l'instrument.

§ 2. — INCLUSIONS A LA PARAFFINE.

A. **Procédé à l'éther.** — Procédé recommandé. — Les pièces à couper, fixées et durcies suivant une des méthodes exposées au chapitre précédent, sont, au sortir de l'alcool absolu, traitées de la façon suivante :

1° Immersion dans l'alcool-éther pendant vingt-quatre heures ;

2° Immersion dans l'éther pendant douze à vingt-quatre heures ;

3° Immersion pendant vingt-quatre heures, dans l'étuve à 37°, dans de l'éther saturé de paraffine molle (fusible à 45°) ;

4° Immersion pendant douze à vingt-quatre heures dans de la paraffine molle liquéfiée, dans l'étuve à 45°.

Ces différentes immersions seront faites dans de petits flacons, à large ouverture, bien bouchés ; au sortir d'un bain l'objet à inclure est immédiatement plongé dans le suivant. La paraffine molle doit se maintenir absolument liquide à 45° ; on trouve aisément cette paraffine dans le commerce.

5° Au sortir de l'étuve, les pièces sont retirées de la paraffine avant que celle-ci ne soit solidifiée : on les laisse refroidir à l'air et quand elles sont devenues dures on les enrobe de la façon suivante :

On choisit un bouchon cylindrique entrant aisément dans la pince du microtome. Autour du bouchon on enroule une bandelette de papier filtre maintenue par une épingle fixée dans le liège, de manière à déterminer un petit cylindre creux de 2 à 3 centimètres de hauteur et dont le fond est constitué par la face supérieure du bouchon il est bon d'avoir, au préalable, pratiqué, avec un scalpel, quelques cannelures sur cette face du bouchon pour en

augmenter l'adhérence avec la paraffine. Avec un pinceau on huile la face interne de la bandelette de papier en évitant de porter de l'huile sur le liège qui constitue le fond du cylindre.

La pièce à couper étant maintenue en bonne orientation dans le moule, à l'aide d'une aiguille emmanchée, on verse autour d'elle de la paraffine dure (fusible à 52°-54°) fondue dans une capsule en porcelaine et qu'on a laissée refroidir jusqu'à formation d'une pellicule à la surface ; on remplit le moule de paraffine en ayant soin que cette substance dépasse de plusieurs millimètres en hauteur l'objet à inclure, à cause de la rétraction qu'elle subit en se solidifiant.

Dès que la paraffine commence à se solidifier, on retire l'aiguille qui maintenait la pièce et on abandonne le moule jusqu'à complet refroidissement. Lorsque la solidification de la paraffine est complète, on enlève l'épingle et on déroule la bande de papier ; on obtient ainsi, adhérent au bouchon, un cylindre de paraffine dans lequel est incluse la pièce à couper. Après que la surface de la paraffine a été égalisée avec un scalpel, on fixe le bouchon dans la pince du microtome et on peut pratiquer les coupes.

B. **Procédé au xylol.** — 1° Au sortir de l'alcool absolu les pièces sont portées dans le xylol pendant une dizaine d'heures.

2° Les pièces sont ensuite maintenues pendant six à douze heures dans une solution saturée de paraffine molle dans le xylol, à la température de 37°.

3° Immerger pendant le même temps la pièce dans la paraffine molle, dans l'étuve à 45°.

4° Au sortir de la paraffine molle la pièce est montée, comme nous venons de l'exposer, dans la paraffine dure.

§ 3. — TRAITEMENT PRÉLIMINAIRE DES COUPES.

Les coupes ne peuvent être traitées par les réactifs colorants qu'après avoir été débarrassées de la paraffine qui les imbibe.

A. **Procédé recommandé.** — 1° Aussitôt faites, les coupes sont portées dans un cristallisoir à couvercle rodé contenant de l'éther ; l'éther dissout rapidement la paraffine; la durée de l'immersion dans l'éther varie de plusieurs minutes à quelques heures, selon les dimensions et le nombre des coupes traitées.

2° Quand les coupes sont débarrassées de la paraffine, on les porte avec une spatule de platine ou de nickel dans un second cristallisoir contenant de l'alcool absolu.

3° Après quelques minutes d'immersion dans l'alcool les coupes

sont transportées une à une, avec la spatule, dans un cristallisoir plein d'eau distillée ; au moment du contact avec l'eau, les coupes présentent un mouvement giratoire très vif, qui les déroule et les étale. Quand les coupes sont fines et fragiles, la brusquerie de ce mouvement giratoire peut les casser et les rendre inutilisables ; il est bon dans ce cas de porter les coupes, au sortir de l'alcool absolu, dans de l'alcool à 70°, puis dans de l'alcool à 40°, et enfin, seulement, dans l'eau distillée.

4° Pour transporter une coupe sur la lame porte-objet, on plonge cette lame obliquement dans l'eau où se trouvent les coupes, on entraîne une de celles-ci avec une aiguille jusqu'au niveau du milieu de la lame, avec l'aiguille on fixe contre la lame l'angle supérieur de la coupe et on sort doucement la lame de l'eau : la coupe s'étale d'elle-même. On enlève l'excès d'eau avec du papier à cigarettes ou du papier de soie découpé en petits rectangles (et non déchiré, pour éviter la présence de barbes qui pourraient accrocher et entraîner la coupe), et la coupe est prête à subir la coloration.

B. **Fixation à l'albumine.** — Le procédé ci-dessus suffit dans la majorité des cas entre des mains expérimentées ; mais quand les coupes sont très délicates (poumon par exemple), elles sont exposées à se déchirer pendant les manipulations qu'il exige. Il faut alors, aussitôt la coupe pratiquée, la fixer, *ne varietur*, sur la lame porte-objet. Le mode de fixation le plus ordinairement employé en bactériologie est celui qui utilise l'albumine de Mayer.

Albumine de Mayer. — Battre deux blancs d'œuf en neige, laisser déposer, filtrer sur papier et ajouter au liquide clair obtenu son volume de glycérine. Conserver dans un flacon bien bouché dans lequel on place un petit fragment de camphre ou de thymol pour empêcher la putréfaction. Au moment de l'usage, rétablir par agitation l'homogénéité du liquide.

Mode d'emploi. — Dès que la coupe est pratiquée, on la porte avec la spatule sur une couche mince d'albumine déposée sur la lame (une gouttelette d'albumine a été placée sur la lame, puis étalée en couche très fine avec la pulpe de l'index). Avec le pinceau on étale la coupe avec soin de façon qu'elle ne fasse pas de plis, puis on exerce une légère pression pour la faire adhérer à l'albumine.

Si les coupes ne s'étalaient pas, on disposerait à la surface de la lame enduite d'albumine une gouttelette d'eau, on placerait la coupe sur cette goutte d'eau, puis on chaufferait légèrement sur la platine chauffante jusqu'à ce que la coupe s'étale ; ce résultat obtenu, on enlève l'excès d'eau avec du papier de soie et on continue l'opération comme ci-dessous.

On chauffe alors très légèrement sur la veilleuse du bec Bunsen la

face libre de la lame porte-objet, en quelques secondes la coupe devient adhérente au verre. Reste à la débarrasser de la paraffine : pour cela on la traite par le xylol, puis par l'alcool absolu ; on peut alors lui faire subir l'action des matières colorantes.

Remarque. — Ce procédé a l'inconvénient de ne pouvoir être employé quand on doit traiter la coupe par un certain nombre de réactifs, qui, tels que les solutions alcalines, le picrocarmin de Orth, etc., ont la propriété de dissoudre l'albumine.

§ 4. — COLORATION DES COUPES.

Il importe, au premier chef, que les microbes présentent une coloration différente de celle du tissu animal, ce qui rend leur recherche et leur étude beaucoup plus aisées : les méthodes de double et de triple coloration sont les procédés de choix; malheureusement ces méthodes ne sont pas applicables aux microbes qui ne résistent pas au Gram et ne se colorent pas par les procédés d'Ehrlich et de Ziehl. Il faut alors se contenter d'une simple différenciation qui permet d'abaisser la teinte du fond (cellules animales) tout en conservant une coloration intense aux bactéries (cellules végétales).

Nous étudierons dans ce chapitre les méthodes de simple coloration et de colorations double ou triple par la méthode de Gram et ses dérivés; nous reporterons au chapitre de la *Tuberculose* l'étude des procédés de Ziehl et d'Ehrlich.

A. — *COLORATION SIMPLE.*

PROCÉDÉS APPLICABLES A LA GÉNÉRALITÉ DES MICROBES.

a. **Procédé de Weigert.** — 1° Déposer sur la coupe quelques gouttes de violet de gentiane aniliné (p. 140). Laisser en contact environ trente minutes; enlever avec du papier de soie l'excès de colorant.

2° Plonger la coupe pendant quelques secondes dans un cristallisoir contenant une solution aqueuse d'acide acétique à 1 p. 200.

3° Plonger la coupe dans l'eau distillée, la laver avec soin; la reprendre sur la lame ; enlever l'excès d'eau avec du papier de soie.

4° Déshydrater *très rapidement* par l'alcool absolu.

5° Éclaircir avec l'essence de girofles, puis le xylol.

6° Monter dans le baume du Canada.

b. **Procédé de Löffler.** — Opérer comme précédemment en colorant la coupe (temps 1) dans le bleu alcalin de Löffler (p. 140) pen-

dant environ quinze minutes, ou la fuchsine de Ziehl (p. 139) pendant cinq à six minutes.

c. **Procédé de Kühne (I).** — 1° Colorer pendant quinze minutes avec le bleu phéniqué ou le bleu ammoniacal (p. 140).

2° Porter la coupe dans l'eau distillée.

3° Porter la coupe pendant quelques secondes dans l'acide chlorhydrique dilué (p. 219).

4° Porter rapidement la coupe dans la solution lithinée (p. 219).

5° Reporter dans l'eau distillée, laver avec soin la coupe, la reprendre sur la lame. Enlever l'excès d'eau avec du papier de soie et laisser la coupe se dessécher, à l'air libre, presque complètement.

6° Déshydrater *très rapidement* par l'alcool absolu.

7° Éclaircir par l'essence de girofle et le xylol.

8° Monter dans le baume.

d. **Procédé de Kühne (II).** — 1° Colorer au bleu phéniqué (p. 139) pendant environ trente minutes.

2° Laver dans l'eau distillée.

3° Traiter par l'acide chlorhydrique dilué (p. 219) jusqu'à coloration bleu pâle.

4° Laver dans la solution lithinée (p. 219).

5° Laver plusieurs minutes dans l'eau distillée; reprendre la coupe sur la lame, enlever l'excès d'eau avec le papier de soie.

6° Déshydrater *très rapidement* par l'alcool absolu légèrement teinté par le bleu de méthylène.

7° Remplacer l'alcool par de l'huile d'aniline également teintée en bleu ; laisser au contact environ deux minutes.

8° Remplacer l'huile teintée par de l'huile d'aniline ordinaire ; laisser en contact une à deux minutes.

9° Éclaircir par l'essence de girofle et le xylol ; remplacer deux fois le xylol pour enlever toute trace d'huile d'aniline.

10° Monter dans le baume.

Cette méthode, très laborieuse, ne colore qu'un nombre restreint de microbes ; nous ne saurions en conseiller l'emploi.

e. **Procédé à la thionine.** — *Procédé recommandé.* — 1° Colorer avec la thionine phéniquée (p. 139), laisser en contact plusieurs minutes.

2° Porter la coupe dans l'eau distillée, la reprendre sur la lame, enlever l'excès d'eau avec le papier de soie.

3° Déshydrater *très rapidement* par l'alcool absolu.

4° Éclaircir par l'essence de girofle et le xylol.

5° Monter dans le baume.

f. **Procédé de Gram pour le bacille typhique.** — 1° Colorer pendant quelques heures dans le violet de gentiane aniliné (p. 140).

2° Laver la coupe dans l'eau distillée.

3° Placer la coupe pendant une minute dans une solution d'acide chlorhydrique à 1 p. 100.

4° Reporter la coupe dans l'eau distillée, la laver avec soin, la reprendre sur la lame, enlever l'excès d'eau.

5° Déshydrater *très rapidement* par l'alcool absolu.

6° Éclaircir à l'essence de girofle et au xylol.

7° Monter dans le baume.

Les bacilles restent seuls colorés.

g. **Procédé au tanin de Nicolle.** — *Procédé recommandé.* — 1° Colorer la coupe pendant deux à trois minutes au bleu de Löffler ou de Kühne (p. 139 et 140).

2° Laver la coupe dans l'eau distillée.

3° Traiter pendant quelques secondes par une solution aqueuse de tanin à 1 p. 10.

4° Porter la coupe dans l'eau distillée, la reprendre sur la lame; essuyer l'excès d'eau.

5° Déshydrater rapidement par l'alcool absolu.

6° Éclaircir à l'essence de girofle et au xylol.

7° Monter dans le baume.

B. — DOUBLE ET TRIPLE COLORATIONS.

PROCÉDÉS APPLICABLES AUX MICROBES PRENANT LE GRAM.

Quand on veut colorer une coupe où se trouvent des microbes prenant le Gram, on commence par teinter le fond (cellules animales) avec une couleur acide ayant peu d'affinité pour les microbes; puis on traite la coupe par le procédé de Gram : les seuls microbes se colorent en violet et se détachent vivement sur le fond.

La coloration du fond est obtenue à l'aide de différentes solutions.

Pour les doubles colorations on emploie l'éosine, la fluorescéine, le carmin (carmin de Orth), le vésuvine, l'hématoxyline de Bœhmer, le jaune aurantia, l'hématéine, etc.

La triple coloration utilise une solution colorante à élections, teintant différemment les divers tissus; on peut ainsi étudier les lésions liées à la présence des microbes dans les organes; on emploie d'ordinaire le picrocarmin de Orth ou l'hématoxyline alliée au jaune aurantia, à l'éosine, etc. Voici les formules des colorants de fond les plus usités :

Solution aqueuse faible d'éosine.

Éosine soluble à l'eau	$0^{gr},50$
Eau distillée	300 à 400 centimètres cubes.

Filtrer.

On préparerait de même les solutions de fluorescéine, de vésuvine, de jaune aurantia, etc.

Hématoxyline de Bœhmer.

Préparer les deux solutions suivantes :

a. Hématoxyline cristallisée....	1 gramme.
Alcool absolu	10 centimètres cubes.

Placer dans un flacon bien bouché.

b. Alun de potasse	20 grammes.
Eau distillée	200 centimètres cubes.

Faire dissoudre à chaud et filtrer après refroidissement.

Au bout de vingt-quatre heures mélanger les solutions *a* et *b*; abandonner huit jours le mélange à l'air libre, puis le conserver dans un flacon bouché et filtrer au moment du besoin.

Hématéine.

Préparer les deux solutions suivantes :

a. Hématéine....	1 gramme.	*b.* Alun de potasse.	50 grammes.
Alcool absolu..	50 centimètres cubes.	Eau distillée...	1 000 centimètres cubes.

La solution *b* est faite à chaud et mélangée immédiatement à la solution *a*. Laisser refroidir le mélange à l'air ; filtrer.

Carmin de Orth.

Solution aqueuse saturée de carbonate de lithine..	100 centimètres cubes.
Carmin n° 40	$2^{gr},50$

Faire dissoudre à froid, en triturant dans un mortier.

Carmin de Orth alcoolisé.

Carmin de Orth	5 volumes.
Alcool à 95°	1 volume.

Mélanger. S'emploie exclusivement pour la coloration des coupes fixées sur la lame avec l'albumine de Mayer, le carmin de Orth ordinaire dissolvant l'albumine.

Picrocarmin de Orth.

Mélanger :

Carmin de Orth....	1 volume.
Eau picriquée saturée	1 à 2 volumes.

Au sortir du picrocarmin les coupes doivent être portées dans le liquide fixateur suivant :

Alcool absolu................	70 centimètres cubes.
Eau picriquée saturée.......	30 —
Acide chlorhydrique pur.....	0gr,5

I. **Double coloration.** — A. **Procédé recommandé.** — 1° Traiter la coupe par la solution faible d'éosine (p. 227) jusqu'à ce qu'elle présente une coloration rose (environ trente secondes).

2° Laver dans l'eau distillée.

3° Traiter la coupe sur la lame, pendant vingt à trente secondes, par le krystall violet phéniqué; la coupe prend une teinte violette.

4° Remplacer la solution colorante par le liquide de Gram, qu'on laisse agir pendant environ trente secondes, en le renouvelant deux à trois fois, jusqu'à ce que la coupe ait pris une teinte noirâtre.

5° Traiter par l'alcool absolu (ou l'alcool absolu et l'huile d'aniline) jusqu'à ce que la teinte rose du fond ait reparu.

6° Éclaircir par l'essence de girofle et le xylol.

7° Monter dans le baume.

Le fond est rose, les microbes prenant le Gram restent seuls colorés en violet.

B. **Procédé de Kühne.** — 1° Colorer la coupe pendant cinq à quinze minutes dans le bleu de Kühne ou le bleu ammoniacal (p. 139 et 140).

2° Laver la coupe dans l'eau distillée.

3° Faire agir la solution de Gram pendant deux à trois minutes.

4° Laver à l'eau distillée.

5° Décolorer avec une solution saturée de fluorescéine dans l'alcool absolu.

6° Traiter par l'alcool absolu pur, l'essence de girofle et le xylol.

7° Monter dans le baume.

Les microbes sont violets; le fond est à peine teinté par la fluorescéine.

II. **Triple coloration.** — A. **Procédé recommandé.** — 1° Traiter pendant environ cinq minutes par le picrocarmin de Orth.

2° Remplacer le picrocarmin par le liquide fixateur; laisser agir environ trente secondes.

3° Laver dans l'eau distillée.

4° Colorer pendant vingt à trente secondes par le krystall violet phéniqué.

5° Remplacer la solution colorante par le liquide de Gram, le laisser agir pendant environ trente secondes.

6° Décolorer par l'alcool absolu ou l'alcool absolu et l'huile d'aniline.

7° Faire agir successivement l'alcool absolu teinté légèrement par l'acide picrique, l'essence de girofle et le xylol.

8° Monter dans le baume.

B. **Procédé de Nicolle.** — S'applique à la coloration des coupes fixées sur la lame avec l'albumine de Mayer.

1° Faire agir sur la coupe le carmin de Orth alcoolisé pendant quinze minutes.

2° Laver à l'eau distillée.

3° Faire agir le violet de gentiane phéniqué (p. 139) pendant quatre à six secondes.

4° Remplacer le violet de gentiane par du Gram fort (p. 217) que l'on renouvelle deux fois pendant quatre à six secondes.

5° Décolorer par l'alcool-acétone au tiers (p. 217).

6° Faire agir quelques instants l'alcool absolu picriqué.

7° Éclaircir à l'essence de girofle et au xylol.

8° Monter dans le baume.

C. **Procédé de Claudius.** — 1° Fixer la coupe sur la lame avec l'albumine de Mayer.

2° Colorer pendant dix à quinze minutes avec le carmin de Orth alcoolisé.

3° Laver à l'eau distillée.

4° Colorer pendant deux minutes avec la solution aqueuse à 1 p. 100 de violet de méthyle 6B ou le violet de gentiane phéniqué.

5° Faire agir pendant deux minutes la solution picriquée (p. 146).

6° Enlever soigneusement la solution picriquée avec un morceau de papier filtre et déposer sur la coupe une grosse goutte de chloroforme. Absorber le chloroforme avec du papier filtre, et le remplacer par une goutte d'essence de girofle ; recommencer de même jusqu'à ce que la coupe ait pris une teinte rose.

7° Éclaircir au xylol, monter dans le baume.

DEUXIÈME PARTIE

TECHNIQUE SPÉCIALE

CHAPITRE PREMIER

LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

La Bactéridie charbonneuse est l'agent du charbon de l'homme et des animaux (pustule maligne, charbon intestinal, charbon pulmonaire de l'homme; fièvre charbonneuse du cheval; sang de rate du mouton ; maladie du sang de la vache).

L'homme contracte d'ordinaire le charbon par inoculation cutanée, à la faveur d'une solution de continuité du tégument, en maniant des viandes ou des peaux d'animaux morts du charbon ; l'inoculation par les voies digestives, par ingestion de viandes charbonneuses, est rare ; plus fréquente est l'infection par les voies respiratoires à la faveur de poussières chargées de spores charbonneuses (maladie des trieurs de laine, maladie de Bradford).

Les animaux domestiques contractent d'ordinaire le charbon par la voie digestive en avalant des aliments souillés par des spores. Ces spores proviennent du sol, où elles se forment à l'intérieur des bactéridies contenues dans le sang des cadavres charbonneux ; quand les cadavres sont enterrés, les spores sont remontées à la surface dans les déjections des vers de terre et, délayées par la pluie, elles se répandent sur les herbes qui couvrent le sol ; les spores charbonneuses franchissent la barrière épithéliale du tube digestif à la faveur des éraillures causées par la déglutition des corps durs (tels que épines, échardes de bois, etc.), mêlés aux herbes et aux fourrages (Pasteur).

La septicémie charbonneuse est d'autant plus grave que la réaction locale, au point où s'est produite l'inoculation, est moins marquée ; la pustule maligne, de l'homme, où la lésion externe domine la symptomatologie, entraine assez rarement la mort ; chez

les animaux domestiques, où la réaction locale est à peu près nulle (quelquefois *glossanthrax*), la mort est la règle.

Article I. — CHARBON EXPÉRIMENTAL.

1er. — ANIMAUX RÉCEPTIFS ET ANIMAUX RÉFRACTAIRES.

1° **Moutons.** — La marche de l'infection est très rapide, foudroyante ; souvent la mort se produit subitement après un pissement de sang ; l'animal est très sensible à l'inoculation sous-cutanée et à l'ingestion. Le mouton algérien est résistant au charbon (Chauveau).

2° **Rongeurs.** — La souris, le cobaye et le lapin sont très sensibles à l'inoculation sous-cutanée et beaucoup moins à l'ingestion. Les rats ordinaires présentent plus de résistance. Le rat blanc est le plus souvent réfractaire, mais cette immunité n'est pas absolue et présente une grande variabilité. Le jeune rat est plus sensible que le rat adulte.

On peut inoculer le charbon plusieurs fois à des rats sans résultat, puis, après une nouvelle inoculation, les animaux prennent le charbon (Straus). Par des passages successifs en rats blancs jeunes, on obtient un virus tuant le rat adulte (Metchnikoff). Le surmenage diminue la résistance du rat et permet de l'infecter (Charrin et Roger). Feser croit l'immunité plus constante chez les animaux nourris à la viande.

Behring, Metchnikoff et Roux, Sawtchenko, ont montré que le sérum des rats blancs contient une *lysine* capable de dissoudre *in vitro* la Bactéridie charbonneuse.

3° **Bovidés.** — Les bovidés, très sensibles à l'ingestion, résistent mieux à l'inoculation sous-cutanée ; après inoculation par la voie digestive, l'animal succombe au bout de quelques heures de maladie : diarrhée sanguinolente, coliques, sueurs, convulsions.

4° **Équidés.** — Le cheval prend rarement le charbon intestinal (épizooties en Russie et en Corse) ; il est plus sensible que le bœuf à l'inoculation sous-cutanée.

5° **Porc.** — Est presque complètement réfractaire au charbon.

6° **Carnassiers.** — Sont en général peu réceptifs ; l'ours et le chat semblent les moins résistants. Le renard est réfractaire (Amler).

Le chien est réfractaire au charbon, sauf le jeune chien qui succombe facilement à l'inoculation intrapleurale (Nocard).

L'inoculation entraîne d'ordinaire chez le chien la formation d'un abcès où la phagocytose est active, et l'animal échappe à la généralisation de l'infection. On peut vaincre la résistance du chien par l'inoculation intraveineuse de grandes quantités de virus, l'injection dans les veines d'une

émulsion de charbon de bois pulvérisé, l'extirpation de la rate, etc. Le chien enragé, inoculé avec 1 centimètre cube d'une culture inoffensive pour le chien sain, succombe au charbon en moins de vingt-quatre heures: le virus ainsi obtenu est considérablement exalté et permet d'obtenir des passages en série chez le chien (Martel).

7° **Oiseaux.** — Les poules sont réfractaires au charbon. Cependant Pasteur a réussi à rendre ces animaux réceptifs en maintenant leurs pattes immergées dans de l'eau froide à 25°; Wagner est parvenu au même résultat en abaissant la température des poules par des injections répétées d'antipyrine.

Le pigeon est un peu moins réfractaire que la poule; il succombe assez facilement à l'inoculation dans la chambre antérieure de l'œil; les jeunes pigeons sont beaucoup plus réceptifs que les adultes.

Le virus ayant passé par le chien tue facilement le pigeon (Martel). Les passages en série par le pigeon renforcent la virulence de la bactéridie: après de nombreux passages on obtient un virus dont l'inoculation sous-cutanée tue le pigeon adulte et même la poule (Metchnikoff).

8° **Vertébrés à sang froid.** — Les batraciens ne sont pas réceptifs; Gibier a cependant pu conférer le charbon à la grenouille en maintenant l'animal inoculé dans de l'eau à 35 degrés.

Sabrazès et Colombot ont montré que l'*hippocampe* (poisson lophobranche) est réceptif au charbon. L'animal, placé dans les conditions normales de son existence, succombe en quelques jours à l'inoculation sous-cutanée de 0cc,25 d'une culture en bouillon; Sabrazès et Colombot attribuent cette réceptivité à l'absence de la rate et à la pauvreté du sang en leucocytes chez l'hippocampe.

§ 2. — PRATIQUE DES INOCULATIONS.

1° **Inoculation sous-cutanée.** — Avec les précautions ordinaires, injecter sous la peau quelques gouttes de sang charbonneux ou mieux d'une culture récente en bouillon.

Les cultures en bouillon à 37°, âgées de deux à trois jours, sont plus virulentes que le sang qui a servi à les ensemencer, probablement à cause de la présence de substances vaccinantes dans le sang charbonneux.

2° **Ingestion.** — Pasteur et Chamberland ont conféré le charbon aux moutons en les alimentant avec des fourrages mêlés d'épines, de fragments de bois et arrosés de cultures charbonneuses sporulées.

3° **Inoculation intraveineuse.** — Injecter dans la veine une petite quantité de culture en bouillon; le sang charbonneux ne doit

jamais être employé dans ce cas, car son injection intraveineuse pourrait causer des embolies mortelles.

4° **Inoculation intramusculaire.** — Se pratique chez les oiseaux selon les règles ordinaires.

§ 3. — SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

A. **Symptômes.** — Nous les décrirons chez le lapin et le cobaye, animaux les plus fréquemment utilisés (inoculation sous-cutanée).

Huit à quinze heures après l'inoculation, apparaît autour du point de pénétration de l'aiguille un peu d'empâtement œdémateux, puis les ganglions voisins se tuméfient ; en même temps, la température centrale s'élève de un à deux degrés centigrades.

L'état général reste bon jusqu'à la vingt-quatrième ou trentième heure pour le cobaye, et la trentième ou cinquantième heure pour le lapin ; à ce moment, l'animal devient inquiet, sa respiration s'accélère, on observe de fréquentes urinations, puis l'animal se ramasse sur lui-même, s'assoupit, sa température s'abaisse jusqu'à 34°-30° ; il tombe dans le coma et meurt en quelques minutes.

B. **Lésions.** — 1° **Lésion locale.** — Au point d'inoculation on constate une infiltration œdémateuse plus ou moins prononcée du tissu cellulaire sous-cutané, l'exsudat est gélatineux, légèrement teinté en rouge, très pauvre en leucocytes, et contient de nombreuses bactéridies (*œdème gélatiniforme*). Les *ganglions lymphatiques* voisins du point inoculé sont volumineux, ecchymotiques, entourés d'une zone d'œdème et renferment de nombreuses bactéridies.

2° **Sang.** — Les bactéridies y apparaissent dès la quinzième heure ; au moment de la mort, le sang est littéralement envahi ; il est noir, poisseux ; il se coagule lentement et ne rougit pas à l'air (*sang dissous*). On constate de l'hyperleucocytose ; les globules rouges sont déformés et s'agglutinent en masses irrégulières dans les préparations (*état agglutinatif*). Les veines sont turgides.

3° **Viscères.** — La Bactéridie charbonneuse est exclusivement aérobie ; la caractéristique anatomique du charbon est la présence des bactéries dans les capillaires sanguins ; les parenchymes des organes ne contiennent pas de microbes, à moins que ceux-ci n'y aient pénétré à la suite de ruptures vasculaires. On constate toujours l'intégrité presque absolue des cellules glandulaires et épithéliales ; au contraire de ce qui existe pour les autres infections, on ne rencontre jamais de lésions dégénératives.

Rate. — Turgescente, diffluente ; contient un véritable feutrage de bactéridies.

Foie, poumons, glandes. — Les capillaires sanguins sont gorgés de bactéridies; les cellules épithéliales ont conservé leur intégrité. Dans la bile, on rencontre parfois de rares bactéridies mises en liberté à la faveur de ruptures vasculaires.

Chez les femelles en lactation, les bactéridies peuvent passer dans le lait par le même mécanisme (Straus et Chamberland).

Reins. — Les capillaires glomérulaires et intertubulaires sont gorgés de bactéridies; l'épithélium est sain; il se produit souvent de petites ruptures vasculaires à la faveur desquelles les bactéries passent dans les tubuli et dans l'urine (Chamberland et Straus).

Épiploon, intestin. — Les vaisseaux de l'épiploon et ceux des villosités intestinales sont gorgés de bactéridies.

Muscles, système nerveux. — Il existe très peu de bactéridies dans les muscles, le tissu nerveux, etc.

Placenta. — Chez les femelles pleines, la bactéridie ne franchit pas le placenta quand les vaisseaux de celui-ci conservent leur intégrité; mais des ruptures vasculaires fréquentes permettent au virus de franchir le filtre placentaire et de pénétrer dans l'organisme fœtal (Straus et Chamberland, Perroncito, Toussaint).

§ 4. — RECHERCHE DE LA BACTÉRIDIE DANS L'ORGANISME.

On recherche la Bactéridie charbonneuse :

1° Dans la lymphe de la pustule maligne, chez l'homme;

2° Dans le sang, les frottis et les coupes d'organes, chez l'homme et les animaux.

Le diagnostic clinique de pustule maligne, chez l'homme, devra toujours être confirmé par le diagnostic bactériologique. Chez l'homme et l'animal vivants, le passage de la bactéridie dans le sang indique la généralisation de l'infection et constitue un signe fatal : dès qu'il est constaté, la mort est proche.

Quand on recherche la bactéridie dans le cadavre, il faut savoir que, très rapidement après la mort, les cadavres charbonneux sont envahis par le *Vibrion septique*, microorganisme qui peut être confondu, à un examen superficiel, avec la Bactéridie charbonneuse (erreur de Jaillard et Leplat).

Prélever du sang, de la sérosité de la pustule maligne, des pulpes d'organes, de l'urine, etc.

Le sang, chez l'homme vivant, sera obtenu par piqûre du doigt ; chez l'animal vivant, on le recueillera de préférence à l'oreille.

Le suc de la pustule maligne est recueilli en pratiquant (après aseptisa-

tion de la peau) une scarification à la lancette à la surface de la pustule. Pour les autres récoltes, se reporter aux règles ordinaires.

On pratiquera des cultures, des examens microscopiques, des inoculations.

a. **Cultures**. — Ensemencer sur les divers milieux, en cultures aérobies, le sang, les pulpes, les sucs, etc.

b. **Inoculations**. — Seront pratiquées de préférence sur le cobaye avec le sang ou un peu de pulpe d'organes délayée dans de l'eau stérile, ou mieux avec une culture ensemencée avec ces matières et âgée de vingt-quatre heures.

c. **Examen microscopique**. — Cet examen doit porter sur les préparations suivantes :

1° Lamelles de sang ;

2° Frottis d'organes et particulièrement de rate ;

3° Frottis de l'œdème gélatiniforme ou du suc de la pustule maligne ;

4° *Épiploon*. — S'adresser de préférence à la souris ; dès que l'animal a succombé au charbon, prélever un fragment d'épiploon, l'étaler sur une lame avec des aiguilles, en laisser les bords se dessécher un peu, puis tirer sur ceux-ci de manière à bien tendre la membrane ; laisser dessécher à demi pour assurer l'adhérence de la membrane au verre, traiter par l'alcool-éther, puis soumettre à l'action des agents colorants.

5° *Coupes de viscères*. — Prélever des fragments de foie, de rate, de poumons et de reins, les fixer par l'alcool absolu, et les monter dans la paraffine. Colorer les coupes comme il est dit plus loin.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

La bactéridie se présente, au microscope, sous trois aspects différents. Dans l'organisme des animaux et de l'homme charbonneux, elle se rencontre exclusivement sous la *forme bacillaire*. Dans les cultures, on observe la *forme filamenteuse* et les *spores*.

I. — *FORME BACILLAIRE.*

Dans le sang des animaux charbonneux, la bactéridie se présente sous la forme de bâtonnets, longs de 5 à 10 μ, larges de 1 à 1,5 μ, droits, flexibles, immobiles, homogènes ; tantôt isolés, tantôt réunis en chaînettes de 2 à 3 articles ; parfois l'intervalle qui sépare chacun

des articles est si peu considérable qu'à première vue on pourrait prendre la chaînette pour un filament homogène.

Examinés sans coloration, ces bâtonnets paraissent transparents comme du verre.

Dans l'œdème gélatiniforme, les bacilles sont toujours un peu plus longs que dans le sang; d'ailleurs, la longueur de la bactéridie est variable chez les différents animaux et aussi suivant la virulence des cultures : les virus légèrement atténués donnent des formes longues; les virus exaltés, des formes courtes et trapues.



Fig. 133. — Sang charbonneux (cobaye). — Méthode de Gram (Reich. Ob. 8a : Oc. II).

Dans l'organisme vivant, la bactéridie ne donne jamais de spores et se reproduit exclusivement par scissiparité.

Coloration. — La bactéridie se colore aisément par toutes les couleurs basiques d'aniline. Elle prend le Gram. Après coloration on observe que ses extrémités ne sont jamais arrondies, mais coupées carrément ; les forts grossissements permettent de constater que ces extrémités ne sont pas nettement rectilignes, mais légèrement sinueuses, comme si le bâtonnet avait été cassé brusquement. Cet aspect est, d'après Koch, caractéristique de la bactéridie.

Coloration des frottis et coupes. — La méthode de Gram sera employée de préférence pour la recherche et le diagnostic de la bactéridie dans les lamelles de sang, frottis et coupes. L'épiploon, les lamelles et frottis seront soumis à la double coloration (éosine et krystall violet), les coupes à la double ou à la triple coloration (picrocarmin de Orth et krystall violet). Suivre la technique exposée pages 216 et 228.

Étant données les dimensions de la bactéridie, l'usage de l'objectif à immersion est d'ordinaire inutile pour l'étude des préparations ; l'objectif 8 à sec suffit.

II. — FORME FILAMENTEUSE.

Dans les cultures, la Bactéridie charbonneuse se présente d'ordinaire en longs filaments. Ces filaments seront étudiés de préférence

dans une culture en bouillon, où ils sont plus longs que sur les milieux solides.

Les filaments bactéridiens ont une largeur de 1 à 2 μ ; ils sont très longs, flexueux, cylindriques, onduleux et souvent enchevêtrés en paquets rappelant des écheveaux de fil. Ils ne sont jamais ramifiés et présentent une immobilité absolue. Ils sont coupés carrément à leurs extrémités.

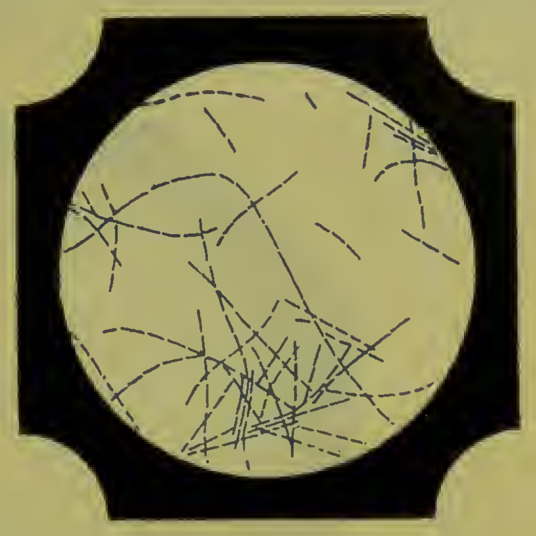


Fig. 134. — Bactéridie charbonneuse (culture en bouillon). — Thionine phéniquée (Reich. Obj. 8a ; Oc. II).

Coloration. — Comme les formes bacillaires, les filaments se colorent par les couleurs basiques d'aniline (utiliser de préférence la thionine ou le krystall violet phéniqués) et prennent le Gram.

Les matières colorantes les montrent constitués par une gaine hyaline à l'intérieur de laquelle se trouve une série d'articles à protoplasma homogène séparés par des cloisons transversales : chacun de ces articles représente une cellule, une individualité, et donne rapidement naissance à une spore.

III. — SPORES.

Pour étudier la formation et l'évolution des spores, il est nécessaire de pratiquer un examen en gouttelette suspendue ; on adoptera de préférence la cellule de Koch, sur la lamelle de laquelle on dépose une goutte d'humeur aqueuse ensemencée avec une trace de sang charbonneux.

En maintenant la cellule à la température de 33°-37°, on voit, peu d'heures après l'ensemencement, apparaître, dans l'intérieur du protoplasma des bactéridies, un petit point réfringent ; puis ce point grossit et devient un corps ovoïde, bien visible, grâce à sa réfringence : c'est la spore, forme de résistance de la bactéridie.

La sporulation ne se produit que lorsque certaines conditions de culture se trouvent réunies : la présence d'oxygène libre est indispensable ; de plus, il faut que les cultures soient maintenues à une température comprise entre + 18° et 41°,5 ; à partir de 42° les spores ne se forment plus.

Bientôt le protoplasma de la cellule mère se désintègre et la spore

n'est plus entourée que par la mince membrane d'enveloppe du filament ; celle-ci disparaît à son tour et la spore est mise en liberté.

Toutes les cellules d'un filament ne donnent pas de spores ; certaines restent stériles ; chaque cellule ne produit qu'une seule spore qui est toujours plus petite que la cellule mère.

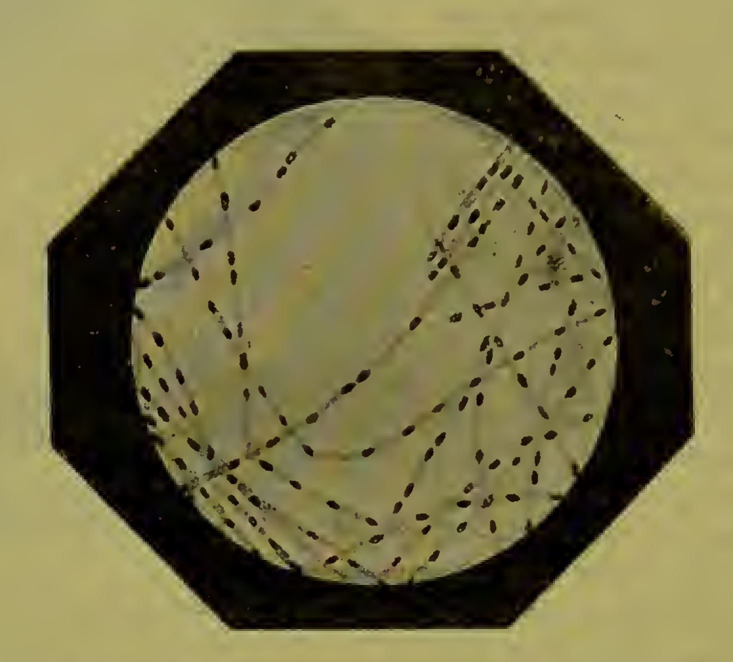


Fig. 135. — Formation des spores chez le *Bacillus anthracis*. 900/1.

Si le milieu est encore nutritif, on voit bientôt la spore évoluer : elle augmente de volume et perd sa réfringence, sa membrane d'enveloppe se résorbe, le protoplasma mis en liberté s'allonge et prend la forme bacillaire (De Bary).

Coloration. — Les spores charbonneuses peuvent être colorées par les procédés indiqués au chapitre IX (1[re] partie). La coloration de ces spores est assez difficile à réussir par la méthode de double coloration : on aura soin en la pratiquant de ne pas décolorer avec les solutions acides, mais simplement avec l'alcool absolu (Voy. p. 149).

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — La bactéridie est essentiellement aérobie. La température optima de culture est de 35°, mais la bactéridie se développe à toutes les températures comprises entre + 14° et 43°. La formation des spores a lieu entre + 18° et 42°. La bactéridie exige un milieu de culture neutre ou légèrement alcalin.

Bouillon. — Au bout de quelques heures à 35° apparaissent de

légers flocons, puis ces flocons s'épaississent, deviennent cohérents et tombent au fond du vase, le bouillon reste clair.

Gélatine. — Est liquéfiée par la bactéridie.

a. *Piqûre.* — A 20°, apparaît, dès le second jour, le long de la piqûre, un trait blanchâtre d'où naissent bientôt, à angle droit, de nombreux et délicats filaments duveteux rappelant l'aspect de l'arbre de Saturne. La culture s'accentue les jours suivants, les filaments s'épaississent, puis la gélatine se liquéfie à la partie supérieure du tube; la liquéfaction envahit peu à peu toute la gélatine et est totale vers le dixième ou douzième jour; dans un liquide clair nagent alors de gros flocons blancs qui finissent par tomber au fond du tube.

Les arborisations manquent quelquefois; la culture est alors réduite à la strie centrale; l'aspect ramifié s'observe surtout quand l'ensemencement a été pratiqué avec du sang charbonneux.

b. *Plaques.* — Vers le second jour apparaissent sur les plaques d'isolement de petits points blanc grisâtre, disséminés dans la gélatine.

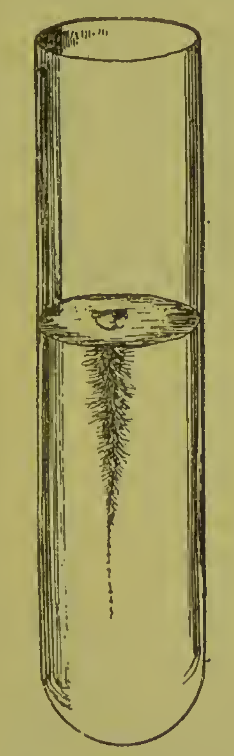


Fig. 136. — Très jeune culture de *Bacillus anthracis* en gélatine.

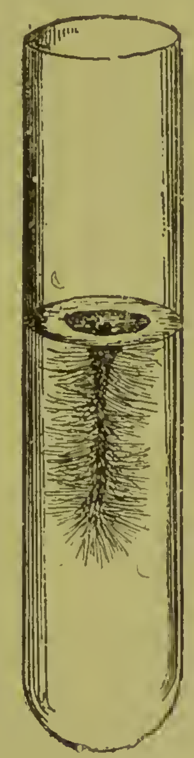


Fig. 137. — Culture de *Bacillus anthracis* plus âgée.



Fig. 138. — Culture de *Bacillus anthracis* en gélatine (8e jour).

Ces points augmentent rapidement de volume et forment des taches brunâtres, granuleuses, arrondies, à bords sinueux; un faible grossissement montre que ces colonies sont constituées par des fila-

ments enchevêtrés, ce qui leur donne l'aspect d'un peloton de fil emmêlé. Vers le quatrième ou cinquième jour, les colonies semblent formées par des mèches ondulées rappelant l'aspect de cheveux bouclés ; puis la gélatine se liquéfie autour des colonies, celles-ci se désagrègent et forment des flocons nageant dans le produit de liquéfaction.

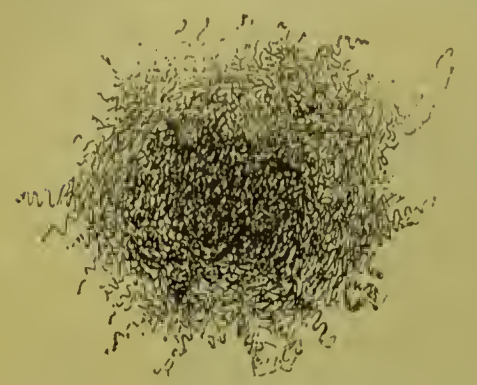


Fig. 139. — Colonie de *Bacillus anthracis* sur gélatine après quatre jours.

Gélose. — Dès le premier jour, dans l'étuve à 35°-37°, apparaît, sur la surface inclinée de la gélose, une strie blanchâtre qui s'épaissit rapidement, devient un peu sèche, friable, et présente des bords légèrement dentelés. Cette culture est peu caractéristique.

Pomme de terre. — A 35°-37°, il se développe, dès le second jour, un enduit blanchâtre qui épaissit rapidement, et prend une coloration blanc sale, qui tourne au brun en vieillissant.

Sérum. — *Sérum liquide.* — A 35°-37°, dès le second jour, il se produit des flocons nuageux qui tombent ensuite au fond du vase.

Sérum solidifié. — Strie d'un blanc mat qui devient grisâtre au bout de quelques jours et liquéfie en partie le sérum.

Lait. — A 35°-37°, en tube, coagulation vers le troisième ou quatrième jour ; le coagulum se redissout vers le huitième jour. Dans un ballon, il ne se produit pas de coagulation et le lait jaunit légèrement.

Gélatine lactosée au tournesol. — Est rougie faiblement.

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ. — RÉSISTANCE.

La bactéridie non sporulée est tuée rapidement quand on l'expose à des températures supérieures à + 50° ; à 51°, le sang charbonneux est stérilisé en une demi-heure. Un abaissement de température même considérable ne tue pas la bactéridie ; elle peut résister une heure à une température de — 100°. Le manque d'oxygène, l'immersion dans l'oxygène comprimé tuent la bactéridie non sporulée.

La spore, forme de résistance de la bactéridie, possède toute la virulence de celle-ci. Les spores humides résistent fort longtemps à la température de + 70° et pendant cinq minutes à 85°. Lorsqu'elles sont desséchées, et particulièrement en présence d'un liquide albu-

mineux (sang, etc.), leur résistance augmente ; elles tolèrent alors des températures supérieures à 100°, le contact de l'alcool absolu, de l'oxygène comprimé, la privation complète d'oxygène, l'exposition au soleil (1), etc. La spore ne se développe pour donner naissance à une bactéridie qu'en présence d'oxygène libre.

Recherche de la bactéridie dans le sol. — Pasteur a utilisé la résistance des spores à la chaleur pour isoler la bactéridie de la terre des *Champs maudits*. On opérera comme il suit :

Prélever une petite quantité de terre, la broyer dans un mortier, puis la mettre en suspension dans de l'eau stérilisée ; il se produit immédiatement un précipité grossier, décanter avec soin le liquide surnageant qui ne contient plus que des particules très ténues, légères, et le laisser déposer dans un verre à pied stérilisé ; le liquide trouble s'éclaircit et il se forme un dépôt au fond du verre. On décante alors le liquide, on aspire le dépôt dans des pipettes que l'on porte, après scellement, pendant quinze à vingt minutes dans un bain-marie à 85°. Après le chauffage, on ensemence des plaques de gélatine, en boîtes de Petri, avec le contenu des pipettes. Les plaques sont observées avec soin, on examine toutes les colonies suspectes, on les ensemence sur les divers milieux et on inocule au cobaye et à la souris les cultures obtenues.

Au cours de ces opérations, les microbes pyogènes sont détruits par le chauffage à 85°, et les cultures sur plaques éliminent les espèces anaérobies, telles que le vibrion septique, dont la présence fausserait les résultats de la recherche. Dans le procédé primitivement employé par Pasteur, le dépôt obtenu par lévigation était inoculé aussitôt après le chauffage, sans isolement des colonies, mais ce procédé est moins rigoureux.

En employant une méthode analogue à celle que nous venons de décrire Diatroptoff a isolé la bactéridie dans la vase du fond d'un puits.

BACTÉRIDIE ASPOROGÈNE.

Pasteur a vu que dans les vieilles cultures en gélatine la bactéridie perd parfois la propriété de former des spores.

Dans le bouillon ensemencé avec du sang charbonneux et mis à l'étuve à 42°,5, la bactéridie se développe, mais ne sporule pas : dans l'intérieur des bâtonnets on peut voir quelques granulations brillantes, ce sont les *fausses spores* de Chauveau qui n'ont aucune des propriétés de la spore. Les bactéridies asporulées ainsi obtenues, réensemencées dans un milieu porté à la température optima, ne tardent pas à donner de nouveau des spores. On peut obtenir une bactéridie définitivement asporulée, en employant un des procédés suivants :

A. Procédé de Roux à l'acide phénique (*Procédé recommandé*). —

(1) Arloing a montré que, dans les cultures, les spores résistent moins à l'action de la lumière solaire que les bactéridies asporulées ; on explique ce fait en disant que la lumière solaire agit plus énergiquement sur les bacilles jeunes issus des spores que sur la bactéridie adulte.

1° Répartir dans de nombreux (30 à 50) tubes à essais, du bouillon de veau peptonisé, légèrement alcalin, à raison de 10 centimètres cubes par tube.

2° Diviser ces tubes en plusieurs séries de 10 chacune. Dans chaque série, les tubes sont numérotés 1, 2, 3... 10; à chaque tube, on ajoute une proportion d'eau phéniquée à 1 p. 100 (sans alcool), telle que :

Le tube n° 1	contienne	2/10 000	d'acide	phénique, soit	$0^{cc},20$	de la solution.
n° 2	—	4/10 000	—	—	$0^{cc},40$	—
n° 3	—	6/10 000	—	—	$0^{cc},60$	—
. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
n° 10	—	20/10 000	—	—	$2^{cc},00$	—

3° Les tubes sont bouchés à l'ouate et leur extrémité est scellée à la lampe au-dessus de l'ouate, pour empêcher l'évaporation de l'acide phénique, puis ils sont stérilisés à l'autoclave.

4° Après refroidissement, chaque tube est ouvert et ensemencé avec une goutte de sang charbonneux; on doit avoir soin de ne pas déposer de sang sur la paroi du tube, hors du bouillon.

5° Après l'ensemencement, les tubes sont munis d'un capuchon de caoutchouc et placés à l'étuve à 33°-37°.

6° Vers le dixième jour, on examine les cultures; un certain nombre de tubes n'ont fourni aucun développement : ce sont ceux où se trouvent les plus fortes doses d'acide phénique (tubes 7 à 10 par exemple); les premiers tubes (de 1 à 3, par exemple) contiennent des bactéridies et des spores; enfin les tubes 3, 4, 5, 6 pourront renfermer des bactéridies à l'exclusion absolue des spores. Mais on n'obtient pas toujours des résultats satisfaisants, aussi est-il nécessaire d'opérer simultanément sur plusieurs séries de tubes.

Recherche des spores dans les cultures. — Pour vérifier si le contenu des tubes ne renferme plus de spores, on en aspire une petite quantité dans de très fines pipettes Pasteur, étranglées au-dessous du tampon d'ouate (fig. 51). On ferme à la lampe les deux effilures de la pipette, et on place les tubes scellés obtenus dans un bain-marie à 65°-70° pendant environ quinze minutes. Si la bactéridie n'est pas sporulée, elle est détruite par ce chauffage et les tubes de bouillon neuf ensemencés avec le contenu des pipettes restent stériles; ces tubes cultivent au contraire si la bactéridie est sporulée.

Ce procédé de préparation du charbon asporogène ne donne pas dans tous les cas des résultats satisfaisants : tantôt aucun des tubes ne contient de bactéridie asporogène, tantôt on obtient bien des bactéridies asporogènes, mais elles reprennent la faculté de donner des spores après quelques passages en bouillon à 33°-37°.

Surmont et Arnould ont montré que la faculté de devenir asporogènes varie beaucoup pour les bactéridies de diverses provenances : une bacté-

ridie venant de l'institut Pasteur devenait facilement asporogène entre les mains de ces expérimentateurs, tandis qu'ils échouaient quand ils s'adressaient à une bactéridie recueillie par eux dans un cas de charbon humain.

B. **Procédé de Chamberland et Roux au bichromate.** — Ce procédé, antérieur au précédent, donne des résultats inconstants; le bichromate est employé d'après les mêmes règles que l'acide phénique, mais en proportions différentes : la solution dans le bouillon à 1 p. 2 000 est celle qui convient le mieux.

C. **Procédés divers.** — Nous ne citerons que pour mémoire les procédés de Behring à l'acide rosolique et à l'acide chlorhydrique et celui de Phisalix basé sur l'emploi de la chaleur (cultures successives à 42°,5). Ces méthodes donnent des résultats très incertains.

§ 2. — VIRULENCE. — ATTÉNUATION. — VACCINATION.

Le charbon ne récidive pas chez l'homme; en règle, il est mortel chez les animaux domestiques; cependant des vaches ayant résisté au charbon supportèrent par la suite, sans accident, l'inoculation d'une bactéridie très virulente (Pasteur); d'autre part, on avait constaté, dans la Beauce, que certains moutons restaient réfractaires au charbon et l'on supposait, pour expliquer cette immunité, que ces animaux avaient eu antérieurement une atteinte de charbon avorté. Pasteur songea à conférer aux animaux une maladie charbonneuse bénigne pour les préserver de l'affection épizootique.

Atténuation. — Pour arriver à ce résultat, la première condition à remplir est d'obtenir un virus atténué; or, la spore conservant et perpétuant la virulence de la bactéridie qui lui a donné naissance, il faut empêcher la bactéridie de former des spores. On opère ainsi qu'il suit :

1° On ensemence du sang charbonneux dans un ballon de bouillon que l'on place à l'étuve à 42°,5 : la bactéridie se développe, mais ne donne pas de spores.

La culture est très virulente les premiers jours, mais sa virulence faiblit bientôt, et vers le huitième ou dixième jour, elle est devenue inoffensive pour le cobaye et le lapin. Cette atténuation est due à l'action combinée de l'air et de la chaleur sur le microbe.

Prend-on une culture ainsi atténuée et l'inocule-t-on à un mouton, cet animal ne présente qu'une maladie très légère et, quand il est rétabli, il résiste à l'inoculation d'une culture pleinement virulente. *L'inoculation du virus atténué confère l'immunité.*

2° En ensemençant dans un ballon maintenu à 33°-37° la bactéridie atténuée, elle forme de nouveau des spores et ces spores fixent la

virulence actuelle : on peut ainsi conserver indéfiniment une *race* dont le degré de virulence est déterminé et invariable.

Restitution de la virulence. — A la bactéridie atténuée, devenue saprophytique, on peut rendre sa virulence par une série de passages chez les animaux appropriés.

Soit une bactérie ne tuant plus la souris adulte, on l'inocule à une souris venant de naître : celle-ci meurt en deux ou trois jours. Avec le sang de ce premier animal, on inocule une seconde souris âgée de trois jours qui succombe à son tour et dont le sang sert à inoculer une souris de six jours. Celle-ci fournira un sang charbonneux capable de tuer une souris adulte : le sang de cette souris servira à inoculer un jeune cobaye ; on continuera la série par un cobaye adulte, un lapin, puis on passera au mouton, au bœuf, et on arrivera à posséder de nouveau une bactéridie excessivement virulente.

Pratique des vaccinations. — L'animal est d'autant mieux immunisé que l'atteinte vaccinale est plus forte. D'autre part, il y a un danger à inoculer de prime abord un vaccin énergique : on risque de tuer l'animal qu'on désire préserver.

On concilie ces deux cnosidérations en utilisant deux vaccins : on inocule d'abord un vaccin à peu près inoffensif, tuant la souris, mais n'ayant aucune action nocive sur le lapin et le mouton (*premier vaccin*). Puis, au bout d'une douzaine de jours, on inocule le *second vaccin* qui a subi une atténuation moins prolongée et qui est capable de tuer la souris, le cobaye et quelquefois le lapin (2 fois sur 6 ou 8) ; douze jours après cette seconde inoculation, l'immunité est acquise.

Le vaccin préparé par l'institut Pasteur est livré aux vétérinaires par tubes de 100 doses (au prix d'un sou la dose) ; on inocule successivement le premier et le deuxième vaccin, à la vache à la dose de 1/4 centimètre cube et au mouton à la dose de 1/8 centimètre cube.

Les inoculations se font, d'ordinaire : pour le premier vaccin, à la face interne de la cuisse droite ; pour le second, à la face interne de la cuisse gauche ; on met un intervalle de douze jours entre les deux inoculations. Il est nécessaire d'employer le vaccin dès qu'il a été fourni et de pratiquer les inoculations avec une seringue stérilisée ; il importe de ne pas utiliser un produit souillé qui, du fait même de la souillure, perd toutes ses propriétés. Dans toutes les contrées où l'on pratique les vaccinations le charbon est en voie de disparition.

Immunisation des petits animaux. — L'immunisation des petits animaux, nécessitée par les recherches de laboratoire, est difficile à obtenir ; la sensibilité des lapins et cobayes est telle que la mort survient souvent au cours des vaccinations. Il est bon d'avoir, dans ce cas, au moins trois vaccins de virulence croissante ; le premier vaccin

doit être très atténué, puis on passe au *premier vaccin pour moutons*, enfin au second ; les inoculations seront faites très prudemment.

Marchoux a obtenu l'immunisation au moyen des seuls vaccins pour moutons : il cultive ces vaccins à l'étuve à 37° dans du bouillon de veau peptonisé et utilise les cultures âgées de vingt-quatre heures. On commence par inoculer au lapin, sous la peau, 1/2 centimètre cube de premier vaccin (dose maxima non mortelle). Il se produit un peu de fièvre, de la diarrhée et une diminution de poids. Au bout de douze jours, on donne une dose double du même virus ; après une nouvelle période de douze jours, on injecte 1/4 de centimètre cube du deuxième vaccin, puis, après douze jours encore, 1/2 centimètre cube du même vaccin. Huit jours après cette inoculation, on peut éprouver l'animal avec quelques gouttes de sang charbonneux injectées sous la peau ; si la réaction n'est pas trop forte, on complète l'immunisation par des inoculations fréquentes de sang charbonneux ou de cultures virulentes âgées de vingt-quatre heures. Par ce procédé, Marchoux est arrivé à obtenir des lapins supportant des doses journalières de 1 centimètre cube de charbon virulent ; d'autres lapins purent recevoir tous les cinq jours des doses progressives atteignant finalement 20 centimètres cubes.

§ 3. — TOXINE CHARBONNEUSE.

Dans les milieux artificiels, la bactéridie transforme les albuminoïdes en ammoniaque (Perdrix) en même temps qu'il se produit, suivant Ivanoff, des acides volatils tels que l'acide formique (domine dans les cultures jeunes), l'acide acétique (domine dans les cultures anciennes), l'acide caproïque, et peut-être l'acide valérianique. Les matières amylacées et les sucres sont transformés en acides lactique et acétique, puis quand ces matières deviennent rares l'acide lactique est consommé à son tour, il en résulte de l'acide acétique qui finit lui-même par être transformé en anhydride carbonique (Mlle Napias). Enfin la bactéridie sécrète une *toxine* dont on n'a pu, jusqu'à présent, déterminer la nature exacte.

I. — Hankin prépare un bouillon d'extrait de Liebig à 1 p. 100, légèrement alcalinisé et stérilisé à l'autoclave, auquel il ajoute 10 à 50 p. 100 de fibrine fraîche, stérilisée elle-même pendant quinze minutes à 115°. Le milieu obtenu est ensemencé avec du sang virulent et maintenu pendant huit jours à 20°. On le filtre alors sur une bougie Chamberland et on précipite le filtrat par le sulfate d'ammoniaque ; le précipité est recueilli sur un filtre et soumis à la dialyse dans un courant d'eau chauffée à 42°-45° ; quand le sulfate

d'ammoniaque a complètement disparu, on verse le liquide du dialyseur dans dix fois son volume d'alcool fort pour précipiter l'albumose; on lave à l'alcool absolu le précipité, on le dissout dans une petite quantité d'eau et on filtre sur amiante.

L'albumose ainsi obtenue injectée à des souris à très petites doses (1,5/1 000 000° du poids de l'animal) leur conférait une certaine résistance contre la bactéridie. Chez les animaux sensibles au charbon, même à des doses de 500 à 700 fois plus fortes que la dose vaccinale, cette albumose ne produit aucun symptôme d'empoisonnement; au contraire, chez les animaux naturellement réfractaires elle agirait comme une toxine énergique (Hankin et Wesbrook). Les conclusions de ce travail ont été critiquées par Petermann et par Marmier.

II. — Au moyen d'une technique très complexe, Brieger et Fränkel isolent des cadavres charbonneux une toxalbumine capable de produire des symptômes d'intoxication chez différents animaux. De même, Sidney Martin, dans des solutions d'alcali-albumine, obtient une albumose qui, à la dose de 3 centigrammes, tue une souris de 22 grammes avec des symptômes analogues à ceux de la septicémie charbonneuse.

III. — Marmier obtient une toxine active en cultivant la bactéridie à basse température dans une solution de peptone pure glycérinée.

Milieu de Marmier. — Commencer par purifier la peptone du commerce. Pour cela, dissoudre dans l'eau une certaine quantité de cette peptone et ajouter à la dissolution assez de sulfate d'ammoniaque pour que la liqueur en soit saturée à 100°. Faire bouillir quelques minutes, puis filtrer. A la liqueur filtrée, ajouter une quantité d'hydrate de baryte suffisante pour précipiter tout l'acide sulfurique qu'elle contient en dissolution. Maintenir le mélange plusieurs heures à une température voisine de l'ébullition pour chasser l'ammoniaque; filtrer pour se débarrasser du sulfate de baryte, porter le filtrat à l'ébullition en y faisant passer d'abord un courant d'air pour éliminer toute trace d'ammoniaque, puis un courant d'anhydride carbonique pour précipiter l'excès de baryte; filtrer. Avec la solution de peptone pure ainsi obtenue, on préparera le milieu suivant :

Eau	1 000 centimètres cubes.
Peptone	40 grammes.
Sel marin	15 —
Phosphate de soude	0gr,50
Phosphate de potasse	0gr,20
Glycérine pure	40 grammes.

Filtrer; répartir dans des ballons Pasteur de 250 centimètres cubes ; stériliser à 115°.

Ensemencer le milieu avec du charbon virulent, porter à l'étuve à 37° pendant quarante-huit heures puis à 20° pendant quinze jours.

On filtre alors la culture et on la sature de sulfate d'ammoniaque,

à la température ordinaire; au bout de quinze heures environ le liquide est filtré sur papier et on lave le filtre avec une solution saturée de sulfate d'ammoniaque. Le précipité resté sur le filtre est traité par une quantité aussi petite que possible de glycérine; au bout de deux jours, on décante, on remplace la glycérine par de la glycérine neuve et on décante de nouveau. Les liqueurs glycérinées sont réunies et mélangées à quatre fois leur poids d'alcool fort; le précipité jeté sur un filtre est lavé à l'alcool absolu, à l'éther, puis desséché dans le vide. On obtient une substance amorphe, pulvérulente, de couleur brun foncé, renfermant de petites quantités de sulfate d'ammoniaque, soluble dans l'eau distillée et dans l'eau phéniquée à 1 p. 100 et ne présentant aucune des propriétés des matières albuminoïdes, des peptones, des para-peptones, ni des alcaloïdes.

Cette substance est douée de propriétés toxiques assez énergiques vis-à-vis du lapin; l'inoculation de faibles doses peut causer la mort de l'animal; la dose toxique varie pour chaque individu dans des proportions assez élastiques : certains lapins succombent à l'inoculation de 25 milligrammes (en solution aqueuse), d'autres exigent des doses de 120 et même 200 milligrammes.

Quelques heures après l'injection, on note une élévation notable de la température centrale; pendant quelques jours, la température oscille largement, puis, si l'animal doit succomber, elle s'abaisse progressivement (jusqu'à 8° au-dessous de la normale); si l'animal se rétablit, au contraire, les oscillations de la température s'atténuent peu à peu. En même temps l'animal maigrit, se cachectise et peut perdre jusqu'à un tiers de son poids; on observe ordinairement de la diarrhée. Avant la mort, apparaît de la paraplégie, la respiration devient pénible, l'animal se couche sur le flanc et présente des convulsions et des contractures.

La mort survient plus ou moins longtemps après l'injection (du deuxième au quinzième et vingtième jour) suivant la dose de toxine inoculée.

Les cobayes, les souris, sont sensibles à la toxine. Contrairement à ce qu'avait vu Hankin, les animaux réfractaires au charbon paraissent presque indifférents à la toxine; il en est de même des lapins immunisés par les cultures atténuées.

La toxine est atténuée, mais non complètement détruite, par le chauffage à 110°; le contact des hypochlorites alcalins ou l'exposition à une insolation prolongée en présence de l'air la rendent inactive.

Les cultures charbonneuses dans d'autres milieux liquides (sérum de sang de bœuf, bouillons de bœuf, de veau, de cheval) contiennent peu de toxine. Marmier a pu extraire une toxine active des cultures récentes sur gélose : on racle des cultures de deux jours, les microbes sont mis à macérer dans de l'alcool à 20° additionné de quelques gouttes d'éther. Après vingt-quatre heures, on filtre et on précipite le filtrat par l'alcool absolu; le précipité obtenu est lavé sur un filtre avec de l'alcool absolu puis de

l'éther; enfin, on le dessèche dans le vide en présence de l'acide sulfurique. La substance pulvérulente obtenue a la même activité que celle que l'on retire des cultures en eau peptonisée glycérinée. Ce résultat indique que primitivement les toxines sont contenues dans le corps des microbes.

VACCINATION PAR LA TOXINE.

I. — Toussaint, chauffant à 55° pendant dix minutes du sang charbonneux défibriné, puis l'inoculant au mouton, conférait l'immunité à cet animal.

On se place dans des conditions plus rigoureuses en chauffant du sang charbonneux à 60°, à trois ou quatre reprises différentes, puis en l'injectant au mouton; on obtient ainsi une immunité peu solide, qui disparaît après un temps variant de un mois à trois ans.

II. — Hankin avait annoncé qu'au moyen de sa toxine préparée en bouillon Liebig-fibrine, on immunise aisément les animaux contre le charbon; après les objections de Petermann, il reprit ses recherches et obtint des résultats moins satisfaisants : si l'injection de doses égales à 1,5/1 000 000 du poids du corps a une action immunisante pour les souris, cette action est passagère et un petit nombre seulement des animaux traités résistent à l'inoculation d'épreuve.

III. — Marmier, à l'aide de la toxine préparée en solution de peptone glycérinée, est arrivé à conférer l'immunité aux animaux de laboratoire. Les lapins, après avoir reçu de petites doses répétées, acquièrent une certaine accoutumance qui ne persiste pas au delà de cinq à six semaines après l'inoculation de la dernière dose. On arrive d'une façon certaine à accoutumer les lapins à des doses de toxine qui auraient été mortelles si elles avaient été données de prime abord.

Pour obtenir l'immunisation, on donne le premier jour une dose très faible, par exemple 3 milligrammes, de toxine à un lapin; dès que l'animal est rétabli, c'est-à-dire après six jours environ, on lui injecte une quantité plus considérable de toxine (6 milligrammes); quand la réaction est terminée, on injecte une troisième dose de 15 milligrammes. Dans la majorité des cas, une douzaine de jours après cette troisième injection, on peut inoculer à l'animal, sans qu'il succombe, du charbon virulent. En portant progressivement à 20 et 30 milligrammes les doses injectées, on obtient presque sûrement l'immunisation; il faut avoir soin d'attendre le rétablissement complet de l'animal avant de faire l'inoculation d'épreuve.

§ 4. — SÉROTHÉRAPIE.

I. — Behring a montré que le sérum des rats blancs jouit de propriétés bactéricides vis-à-vis de la Bactéridie charbonneuse. Quand

on injecte à des souris un peu de culture de charbon additionnée de sérum de rat, les souris ne présentent aucun accident (Voy. p. 231).

Roux et Metchnikoff ont établi que cette action ne s'exerce qu'à la condition qu'il y ait mélange de la bactéridie et du sérum. Quand on inocule séparément la culture et le sérum, les souris succombent fatalement à l'inoculation ; de plus, cette action bactéricide n'a aucun rapport avec l'immunité du rat blanc vis-à-vis de la bactéridie : Roux et Metchnikoff ont montré qu'un grand nombre de rats blancs étaient réceptifs au charbon alors que leur sérum jouissait de la propriété bactéricide.

II. — Marchoux a démontré que le sérum des lapins et des moutons immunisés contre le charbon par la méthode des virus atténués possédait des propriétés préventives et thérapeutiques.

Les lapins doivent être immunisés comme nous l'avons dit page 245 ; les moutons, après la vaccination pastorienne, reçoivent sous la peau des doses de cultures virulentes de plus en plus fortes, doublées de huit jours en huit jours, et finissant par atteindre 200 et 300 centimètres cubes injectés en une seule fois. Il est nécessaire que le mouton supporte ces doses énormes pour que son sérum possède des propriétés préventives et curatives. On laisse ensuite reposer l'animal pendant quinze ou vingt jours et on peut opérer la saignée ; l'expérience montre que c'est à ce moment que le sérum est le plus actif. Une fois recueilli, le sérum conserve longtemps toute son activité.

a. Marchoux a obtenu un sérum de mouton actif au 1/2 000e (dont 1 centimètre cube, injecté vingt-quatre heures avant 1/4 centimètre cube de culture virulente, protégeait un lapin de 2 kilogrammes) ; les inoculations étaient faites sous la peau du flanc, le sérum d'un côté, la culture de l'autre. L'inoculation de la culture sous la peau de l'oreille est plus sévère : pour protéger l'animal, il faut deux fois plus de sérum que dans le cas précédent ; l'inoculation intrapéritonéale de la culture exige des doses encore plus considérables de sérum : au moins 15 centimètres cubes de sérum actif au 1/2 000e pour protéger un lapin de 2 kilogrammes ; dans les cas où l'inoculation de la culture a été pratiquée dans les veines, 20 centimètres cubes de sérum actif à 1/2 000e n'ont pu donner au lapin que trois jours de survie sur le témoin.

L'injection préventive de sérum n'est pas plus active quand elle est pratiquée dans le péritoine que quand on la fait sous la peau ; par contre, l'injection intraveineuse est moins active : 10 centimètres cubes d'un sérum actif au 1/2 000e n'ont pas préservé des lapins de 2 kilogrammes contre l'inoculation sous-cutanée de 1/4 de centimètre cube de culture virulente.

Le sérum actif au 1/2 000e s'est montré inactif chez le cobaye ; Marchoux n'a obtenu qu'une survie plus ou moins longue même avec des doses très fortes de ce sérum.

b. Inoculé en même temps que la culture virulente, le sérum de lapin vacciné a assuré la guérison de l'animal (lapin) 7 fois sur 24 expériences; dans les 17 autres cas, les animaux ont toujours eu une survie sur les témoins. Les doses de sérum injectées variaient de 7 à 17 centimètres cubes. Les lapins qui ont survécu n'ont présenté aucun symptôme de maladie ; tous les individus qui ont eu de l'œdème ont succombé.

c. Un lapin traité, quatre heures après l'inoculation, par 6 centimètres cubes de sérum de lapin vacciné a survécu ; un autre traité sept heures après l'inoculation est mort cent huit heures après le témoin.

Avec un sérum de mouton actif au 1/800e, Marchoux est arrivé à guérir un lapin inoculé depuis sept heures (7 centimètres cubes de sérum); avec le sérum actif au 1/2 000e, l'injection de 10 centimètres cubes faite vingt-quatre heures après l'inoculation a été curatrice.

Quand l'œdème est bien marqué au moment de l'intervention, la guérison ne se produit pas, même avec des doses énormes de sérum (15 à 20 centimètres cubes de sérum actif au 1/2 000e).

d. Quand on injecte le sérum avant ou immédiatement après la culture virulente, le lapin ne présente aucun signe de maladie, mais il n'acquiert pas l'immunité : inoculé plus tard, il succombe au charbon en même temps que les témoins. Au contraire, quand l'intervention a été tardive, quand le sérum a été donné de sept à vingt-quatre heures après l'infection, il se produit un commencement de maladie qui suffit pour conférer à l'animal une résistance solide au charbon.

La sérothérapie du charbon n'a point encore trouvé d'application à la pathologie humaine.

Agglutination. — Les cultures de la Bactéridie charbonneuse ne se prêtent pas à la recherche de l'agglutination, car les microbes y sont accolés les uns aux autres; pour l'étude de ce phénomène, il faut s'adresser aux cultures atténuées, et particulièrement au premier vaccin de Pasteur, avec lesquelles on obtient des émulsions bien homogènes. Ces émulsions sont agglutinées par le sérum des divers animaux neufs (rat, lapin, cobaye, bœuf, cheval, etc.) à la dilution de 1 p. 10 à 1 p. 50. Le sérum humain normal les agglutine énergiquement, et même à 1 p. 500, dans certains cas; « il y a donc lieu, quand il s'agit de charbon, d'être très prudent en matière de sérodiagnostic » (Lambotte et Maréchal).

CHAPITRE II

LE VIBRION SEPTIQUE

Le Vibrion septique est le germe pathogène anaérobie le plus anciennement connu. En 1887, Pasteur fixait la morphologie et la biologie du Vibrion septique, en même temps qu'il décrivait sous le nom de *septicémie expérimentale aiguë*, la maladie qui succède à son introduction dans le tissu cellulaire sous-cutané des animaux de laboratoire ; Chauveau et Arloing ont montré que le vibrion de Pasteur est l'agent de la gangrène gazeuse foudroyante de l'homme (*septicémie gangreneuse*, *érysipèle bronzé*) ; Krannhals lui attribue la *maladie des chiffonniers*. Les auteurs allemands désignent le Vibrion septique sous le nom de *Bacille de l'œdème malin*.

La gangrène traumatique des animaux domestiques est également causée par le vibrion de Pasteur.

Le Vibrion septique est très répandu dans les milieux extérieurs ; il existe à l'état de spores dans la terre de jardin, de rue, dans la vase de différentes eaux, etc. Il se rencontre dans l'intestin : on l'a isolé des matières fécales de l'homme et des animaux ; après la mort, il passe de l'intestin dans le sang ; cette invasion du sang est particulièrement rapide chez les animaux ayant succombé au charbon.

Article I. — SEPTICÉMIE EXPÉRIMENTALE.

§ 1er. — ANIMAUX RÉCEPTIFS.

La plupart des animaux sont réceptifs au Vibrion septique.

Le cobaye et la souris sont d'une sensibilité extrême ; un millionième de goutte de sérosité septique suffit pour tuer un cobaye (Davaine).

Besson a montré que les passages en série par le cobaye exaltent la virulence du vibrion ; on obtient rapidement un virus exalté dont la culture en bouillon tue le cobaye et le lapin en huit heures à des doses infé-

rieures à 1/100e de goutte et le chat en douze à quinze heures, à la dose de 1 goutte.

Le lapin et le rat blanc viennent immédiatement après dans l'échelle de réceptivité; le mouton, la chèvre, le cheval, sont encore très sensibles; il en est de même du chat placé souvent à tort parmi les animaux peu réceptifs. L'âne, les petits oiseaux, la poule, le pigeon sont un peu moins sensibles, puis vient le chien et enfin le bœuf.

Le rat d'égout est à peu près réfractaire; il ne succombe qu'à l'inoculation de doses élevées d'un virus très actif, après avoir présenté une grosse lésion locale purulente.

§ 2. — PRATIQUE DES INOCULATIONS.

Le Vibrion septique est un anaérobie strict; il ne se développe dans l'organisme qu'à la condition d'être inoculé profondément sous la peau, dans les muscles ou dans la cavité péritonéale; il n'infecte pas les plaies superficielles (Chauveau et Arloing).

On peut conférer la septicémie aux animaux par plusieurs procédés:

I. *Inoculation d'une culture ou de sérosité d'œdème.* — L'inoculation sous-cutanée est très sévère; elle tue rapidement les animaux réceptifs, même avec des doses inférieures à 1/100e de centimètre cube.

II. *Inoculation de spores pures. — Associations microbiennes.* — Besson a montré que les spores pures du Vibrion septique injectées même à doses considérables (jusqu'à 4 à 5 millions de spores pour le cobaye et 14 millions pour le lapin) dans le tissu cellulaire sous-cutané des lapins et des cobayes ne se développent pas; elles sont rapidement englobées par les phagocytes et l'animal ne présente aucun autre symptôme qu'un petit nodule dur siégeant au lieu d'inoculation et disparaissant au bout de quelques jours.

On obtient aisément des spores pures en débarrassant les cultures de la toxine par le chauffage : une culture sporulée en bouillon est aspirée dans un petit tube de verre que l'on ferme ensuite aux deux extrémités; le tube est chauffé au bain-marie pendant trois heures à 80°; l'inoculation de grandes quantités de cette culture chauffée est inoffensive, mais les ensemencements en bouillon neuf donnent toujours lieu à une culture très virulente. Un procédé plus simple encore consiste à utiliser des cultures qui ont séjourné plusieurs mois à l'étuve à 37°; la toxine disparaît dans ces cultures et on se trouve en présence de spores pures.

Mais il suffit d'ajouter à quelques spores pures une petite quantité d'une substance chimiotaxique négative pour que les phagocytes ne puissent plus accomplir leur rôle protecteur et pour que la septi-

cémie se manifeste ; c'est ainsi que l'inoculation de quelques spores pures additionnées d'une gouttelette d'acide lactique entraîne fatalement la mort de l'animal ; on arrive au même résultat en ajoutant aux spores une petite quantité de toxine septique, qui est douée de propriétés chimiotaxiques négatives, ou en les protégeant mécaniquement contre les phagocytes en les plaçant dans un petit sac de papier filtre stérile, ou à l'intérieur d'un petit cube de gélose, qu'on introduit sous la peau d'un cobaye.

On arrive encore plus aisément à produire la septicémie par inoculation de spores débarrassées de toxine si on mélange à celles-ci une quantité inoffensive par elle-même de certains microbes dont les produits de sécrétion ont des propriétés chimiotaxiques négatives ; ces microbes favorisants sont très nombreux, on en trouve un grand nombre dans la terre ; le *Micrococcus prodigiosus*, le Staphylocoque doré jouissent de cette propriété.

De même, les traumatismes produisant la mortification des tissus (brûlures, compressions vasculaires, etc.), entraînent le ralentissement de la phagocytose et favorisent le développement des spores.

III. *Inoculation de terre contenant des spores.* — L'inoculation sous-cutanée d'une trace de terre de rue ou de jardin entraîne souvent la mort du cobaye et du lapin par septicémie. Le développement des spores contenues dans la terre est facilité par leur association aux microbes favorisants très nombreux dans le sol.

§ 3. — SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

La septicémie de Pasteur présente la même évolution chez les différents animaux ; elle est simplement plus ou moins rapide suivant les espèces. Nous décrirons comme type la maladie du cobaye.

Après inoculation d'une trace de culture virulente sous la peau de la cuisse ou de l'abdomen, il se produit très rapidement de l'œdème au point d'inoculation ; au bout de quelques heures, l'animal se blottit dans un coin de la cage, il reste immobile et pousse des cris dès qu'on le saisit, son poil se hérisse ; bientôt apparaissent des secousses convulsives et la mort termine la scène souvent en moins de douze heures.

Quand le virus est très exalté, l'œdème est insignifiant, la marche de la septicémie se précipite, la mort arrive presque subitement après très peu d'heures de maladie.

A l'*autopsie*, on constate la plus ou moins grande extension de l'œdème au point d'inoculation ; aux alentours, les muscles sont rouges, jambonnés, infiltrés de sérosité, le tissu conjonctif est dis-

tendu par des bulles d'un gaz fétide et crépite sous le doigt.

Le cadavre entier dégage une odeur puante; la cavité péritonéale contient une sérosité plus ou moins abondante, à peine louche; le foie est décoloré, la rate est diffluente, les poumons ont l'aspect normal.

La sérosité de l'œdème contient le vibrion en abondance et ne renferme pas de leucocytes; la sérosité péritonéale examinée au microscope donne aussi l'apparence d'une culture pure de vibrions ; jamais ces vibrions ne sont sporulés pendant la vie de l'animal, mais les spores y apparaissent rapidement après la mort, surtout si on place le cadavre dans l'étuve à 35°.

Pendant la vie, on trouve très rarement le vibrion dans le sang de l'animal; mais il y passe assez rapidement après la mort; on obtient des lamelles de sang riches en microbes en laissant le cadavre quelques heures à 35°.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Vibrion septique se présente sous la forme de bâtonnets longs de 3 à 15 μ, larges de 0,6 à 1 μ, plus fins que la Bactéridie charbonneuse, isolés ou réunis en chaînettes ; celles-ci sont surtout fréquentes dans le sang des cadavres conservés quelques heures à 37°; elles constituent alors des filaments atteignant jusqu'à 40 μ de longueur et composés de segments inégaux. Les bâtonnets sont parfois droits, plus souvent flexueux, ondulés. Leurs extrémités sont coupées nettement, à peine arrondies aux angles ; leur aspect diffère entièrement de celui de la Bactéridie charbonneuse (ligne sinueuse à angles accusés).



Fig. 140. — Vibrion septique (frottis avec la surface du foie d'un cobaye). — Thionine phéniquée (Reich. Ob. 1/12 imm.; Oc. II).

Le Vibrion septique est mobile, mais sa mobilité ne se manifeste qu'en l'absence de l'air ; aussi la recherchera-t-on au centre et non sur les bords de la préparation ; les bâtonnets sont animés d'un mou-

vement de reptation lent et ondulant, produit par des cils vibratiles situés de chaque côté du bâtonnet.

Dans le cadavre des animaux et dans les cultures se forment rapidement des spores ; la spore apparaît comme un point ovoïde brillant, réfringent, produisant un renflement, soit à la partie médiane, soit à une des extrémités des bâtonnets isolés.

Coloration. — Le Vibrion septique se colore aisément par les couleurs basiques d'aniline. Il prend le Gram, mais la réaction est inconstante si l'on ne prend pas certaines précautions : le colorant de choix est le violet de gentiane phéniqué et il doit rester cinq à dix minutes en contact avec la préparation avant l'action de la solution iodée. Le vibrion se colore très bien par la méthode de Claudius.

Les spores et les cils seront colorés par les méthodes exposées au chapitre IX (1re partie).

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le vibrion de Pasteur est un anaérobie strict ; on ne peut le cultiver qu'en utilisant les méthodes décrites au chapitre VI (1re partie).

Le vibrion cultive à partir de + 15° ; la température optima est 37° environ ; nous avons encore obtenu des cultures abondantes à 41°.

Bouillon. — A 37°, apparition d'un trouble marqué vers la douzième ou vingtième heure; il se produit en abondance des gaz d'odeur infecte (anhydride carbonique et hydrogène mélangés à des hydrocarbures et des gaz sulfurés). Bientôt le bouillon s'éclaircit et il se forme un dépôt au fond du tube. Tant que le bouillon est trouble il renferme de nombreux bacilles qui sporulent à partir de la vingtième ou vingt-quatrième heure. Dans le dépôt il n'existe plus que des spores et des bacilles granuleux et désagrégés.

Milieux albumineux. — La culture se produit comme dans le bouillon, mais plus abondamment ; le bouillon additionné de sang ou de liquide d'ascite, le bouillon Martin, le sérum pur ou étendu de son volume d'eau ou de bouillon, le jus de viande stérilisé par filtration sur la bougie Chamberland donnent de très riches cultures.

Le milieu suivant nous paraît donner les cultures les plus abondantes : à 500 grammes de viande maigre de bœuf, finement hachée, on ajoute 500 centimètres cubes d'eau distillée et une forte pincée de sel marin. On abandonne le tout au repos à la glacière pendant douze à vingt heures ; au bout de ce temps, on décante le liquide et on exprime le résidu à la presse à viande ; le jus obtenu est additionné de solution normale de soude jusqu'à réaction alcaline faible, puis chauffé à 115° pendant cinq minutes. Au sortir de l'autoclave filtrer sur papier Chardin ; le liquide brun foncé

obtenu est stérilisé à 112° pendant vingt minutes ; il se forme un léger coagulum pendant la stérilisation, ce coagulum se dissout pendant la culture.

Gélatine. — *Piqûre profonde.* — A 22°, le développement commence au bout de deux ou trois jours ; le long de la piqûre apparaissent de petites sphères nuageuses qui confluent rapidement, formant une longue traînée blanchâtre ; dès ce moment, apparaissent des bulles de gaz qui fissurent la gélatine et la culture se propage irrégulièrement dans ces fissures, la liquéfaction survient très rapidement et s'étend à toute la gélatine.

Colonies isolées. — Dès le deuxième ou troisième jour, apparition à l'intérieur de la gélatine de petites taches nuageuses blanchâtres, à contours mal définis, qui liquéfient le milieu autour d'elles; il se forme des bulles de gaz.

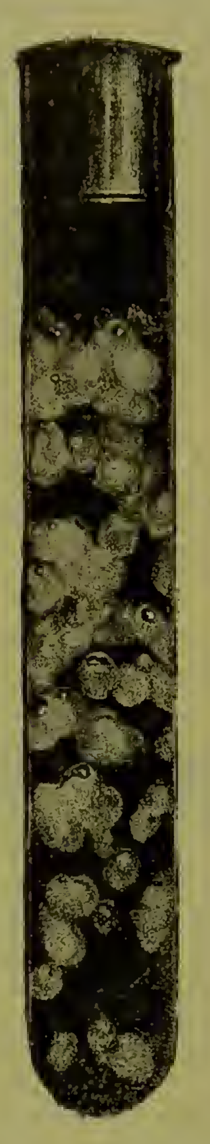


Fig. 141. — Culture de Vibrion septique dans la gélatine (D'après Fränkel et Pfeiffer).

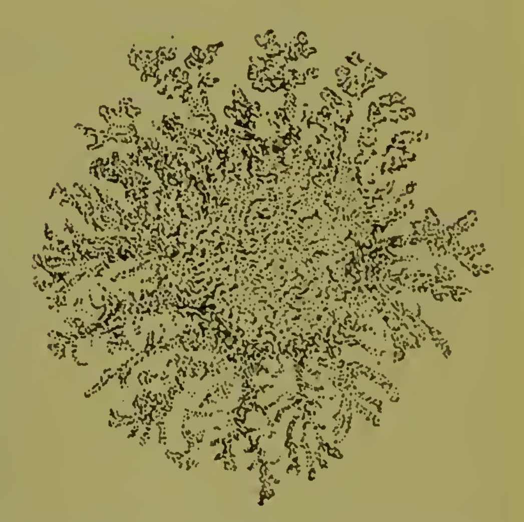


Fig. 142. — Vibrion septique. — Colonie isolée dans la gélose (D'après Liborius).

Gélose. — *Piqûre profonde.* — A 37°, très rapidement il se développe une traînée blanchâtre nuageuse le long de la piqûre; des bulles de gaz fragmentent la gélose et la culture envahit les fissures.

Pomme de terre. — Pas de culture apparente.

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Vitalité. — Les vibrions non sporulés périssent facilement au contact de l'air ou par une exposition de quelques instants à une température de + 60°.

Les spores ne se forment qu'à l'abri de l'air, mais une fois formées, elles résistent très bien à l'action de l'oxygène. Les solutions antiseptiques usuelles sont à peu près sans action sur elles (Chauveau et Arloing). A l'état humide, elles supportent pendant plusieurs heures une température de 80° et résistent plus d'une demi-heure à 90° (Besson); desséchées dans les matières albuminoïdes, elles ne sont tuées par la chaleur humide qu'à des températures supérieures à 100°. D'après San Felice, elles ne sont pas atteintes par une exposition de cinquante heures à la lumière solaire ni par une dessiccation prolongée pendant plusieurs mois.

Virulence. — La spore fixe la virulence du vibrion; cette virulence se maintient indéfiniment dans les cultures, mais pour la pratique des inoculations, il faut toujours rajeunir la culture, étant donné qu'aux doses ordinaires, les spores seules sont inactives et que la toxine s'altère par le vieillissement (Voy. p. 253). Faute de prendre cette précaution, on s'exposerait à conclure à une atténuation du germe, atténuation qui ne se produit pas en réalité.

Nous avons dit qu'il est aisé d'exalter la virulence du vibrion par les passages en série chez le cobaye.

Leclainche et Vallée ont montré que le procédé d'atténuation par la chaleur, imaginé par Arloing, Cornevin et Thomas pour le charbon symptomatique, est applicable au Vibrion septique. On recueille le sang d'un animal mort de septicémie, et on le porte cinq jours à l'étuve à 37° dans des ampoules scellées. Au bout de ce temps le contenu des ampoules est traité suivant le procédé d'Arloing (Voy. p. 268). La poudre obtenue constitue un virus atténué avec lequel on peut conférer aux animaux l'immunité contre la septicémie.

§ 2. — TOXINE.

I. — Dès 1887, Roux et Chamberland ont étudié le poison que le vibrion produit dans les cultures et dans l'organisme vivant.

Après l'inoculation, le vibrion se multiplie et envahit rapidement la totalité de l'organisme : il ne faut donc pas s'attendre à ce que sa toxine ait la même activité que celle des microbes qui, comme les

Bacilles du tétanos et de la diphtérie, cultivent uniquement au point d'inoculation. Alors que les toxines de ces derniers microbes amènent la mort des petits animaux de laboratoire à des doses presque infinitésimales, le filtrat des cultures du Vibrion septique ne produit une maladie mortelle, chez les mêmes animaux, qu'autant qu'on en injecte plusieurs centimètres cubes.

En filtrant sur la bougie de porcelaine la sérosité des muscles de cobayes et de lapins ayant succombé à la septicémie, Roux et Chamberland obtiennent un liquide qui, injecté dans le péritoine d'un cobaye, entraîne la mort à la dose de 40 centimètres cubes.

II. — Besson a repris l'étude du poison septique; il a utilisé des cultures filtrées à la bougie Chamberland, et aussi, après semblable filtration, de la sérosité recueillie sur des animaux venant de sucomber à la septicémie expérimentale aiguë.

a. Pour les cultures, il faut choisir un milieu permettant au microbe de fabriquer la plus grande quantité possible de toxine. Les cultures en bouillon ordinaire conviennent mal : leur filtrat est peu toxique. On obtient de meilleurs résultats avec les cultures en pulpe de viande.

Dans un flacon de 1200 à 1 500 centimètres cubes de capacité, on met 500 grammes de viande de bœuf hachée et quelques centimètres cubes d'une solution de soude à 1 p. 100 ; le flacon, bouché à l'ouate, est porté à l'autoclave à 115° pendant vingt minutes. Après refroidissement, on ensemence avec un peu de sérosité prise sur un cobaye mort de septicémie. Au bouchon de ouate, on substitue un bouchon de caoutchouc stérilisé portant deux tubes dont l'un plonge dans le contenu du flacon, se recourbe à angle aigu et se termine par une extrémité effilée : il servira à décanter le liquide, après culture. L'autre tube s'arrête à la partie supérieure du flacon ; à l'extérieur il est coudé à angle droit, renferme une bourre de ouate et porte un étranglement près de son extrémité. C'est à ce dernier tube que l'on adapte la machine à vide. Le vide fait dans le flacon, le tube est fermé d'un trait de chalumeau, au niveau de l'étranglement, et le flacon est porté à l'étuve à 37°. Au bout d'une vingtaine d'heures, de nombreuses bulles de gaz viennent crever à la surface de la bouillie pâteuse que contient le flacon, la viande prend une teinte rose vif caractéristique, et il tend à se former deux couches : dans un liquide trouble et rougeâtre, baigne une masse semi-solide, crevassée, irrégulière. Vers la fin du deuxième jour, il est utile de casser avec une pince l'extrémité du tube que l'on a fermé au chalumeau : les gaz dégagés par la culture s'échappent immédiatement en sifflant, et une odeur infecte se répand dans la salle : ces gaz, formés en grande abondance et comprimés dans le flacon, gênent la culture et, faute de leur donner issue, on n'obtiendrait jamais qu'un produit peu toxique. Après leur évacuation, la culture se produit à l'abri de l'air, le flacon étant constamment rempli, à la pression atmosphérique, par l'acide carbonique et l'hydrogène dégagés par le développement du vibrion.

L'expérience a montré que le maximum de toxicité des cultures se ren-

contre vers le sixième jour, puis leur activité baisse rapidement : c'est donc à ce moment que le flacon sera retiré de l'étuve. La partie liquide est décantée, la partie solide est passée à la presse à viande et la sérosité obtenue est mêlée au produit de la décantation ; le tout est filtré sur une bougie Chamberland.

La toxine ainsi obtenue est plus active que celle de Roux et Chamberland. Une dose de 3 à 5 centimètres cubes, injectée dans le péritoine, confère aux cobayes de 450 à 600 grammes une affection passagère dont les symptômes rappellent les phénomènes terminaux de la septicémie, mais qui guérit rapidement. Des doses analogues ou plus considérables, injectées dans le tissu cellulaire sous-cutané, ont beaucoup moins d'influence sur l'état général et ne font guère varier la température : mais, localement, elles produisent de l'œdème ou une escarre.

L'injection intrapéritonéale de doses comprises entre 5 et 10 centimètres cubes tue rapidement des cobayes de 300 à 400 grammes.

Chez le cobaye et le lapin les injections fréquemment répétées de petites doses de toxine produisent d'ordinaire une intoxication chronique aboutissant à la mort.

Quand la mort succède à une injection intrapéritonéale de toxine, on trouve, à l'autopsie, l'intestin congestionné, le péritoine rouge-hortensia, et il existe un peu de sérosité stérile dans la cavité péritonéale.

L'addition de solution iodée semble modifier très peu les propriétés de la toxine septique. La chaleur a plus d'action : le chauffage des cultures à 80° et 100° diminue notablement l'activité du poison.

Le vieillissement de la toxine à la température de 35°, à la lumière diffuse, en altère rapidement les propriétés. Il n'en est pas de même du vieillissement en vase clos, à l'abri de l'air et de la lumière, à la température du laboratoire : dans ces conditions, le poison conserve toute son activité.

b. Le produit obtenu en filtrant de la sérosité d'œdème d'animaux morts de septicémie s'est montré beaucoup moins actif que la toxine fournie par les cultures en viande. Injectée à la dose de 2 à 10 centimètres cubes dans le péritoine de cobayes de 280 à 350 grammes, cette sérosité filtrée a toujours été inoffensive. Chez le cobaye de 300 grammes, en obtient une maladie plus ou moins grave, mais aboutissant toujours à la guérison avec une dose de 15 à 20 centimètres cubes. La mort n'a été obtenue qu'après injection intrapéritonéale de 30 à 40 centimètres cubes.

Propriétés chimiotaxiques. — La toxine du Vibrion septique possède des propriétés chimiotaxiques négatives (Besson).

On aspire de la toxine dans des tubes capillaires, puis avec un léger trait de chalumeau on ferme ceux-ci à une extrémité : on obtient ainsi de petits tubes, longs de 2 à 3 centimètres, pleins de toxine et ouverts à un seul bout. Ces tubes sont introduits, au moyen de très petites incisions, sous la peau de lapins et de cobayes; au bout de huit, dix et vingt heures, on les enlève et on examine leur contenu. Tandis que des tubes témoins renfermant un peu du bouillon qui a servi à la culture et introduits en même temps sous la peau, contiennent à ce moment un liquide louche, très riche en leucocytes, le contenu des tubes de toxine est resté limpide et l'examen microscopique n'y décèle aucun leucocyte. Ce n'est que pour des durées d'inclusion de vingt-quatre à trente heures que ces derniers tubes peuvent présenter des leucocytes, soit qu'au contact prolongé des tissus vivants les propriétés du poison aient subi des modifications, soit que la toxine ait diffusé et ait été remplacée par de la lymphe.

Le chauffage à 85° pendant deux à trois heures modifie complètement les propriétés chimiotaxiques de la toxine : de négatives, elles deviennent positives, et les tubes insérés sous la peau des lapins et des cobayes ne tardent pas à se remplir de leucocytes.

§ 3. — VACCINATION.

Roux et Chamberland sont parvenus à vacciner le cobaye en lui injectant à plusieurs reprises dans la cavité péritonéale de fortes doses de cultures en bouillon chauffées dix minutes à 110°; après injection en trois fois à trois jours de distance de 120 centimètres cubes de culture chauffée, les animaux ont acquis l'immunité.

L'immunisation par injection de doses progressives de cultures en viande filtrées est très laborieuse (Besson), le plus grand nombre des animaux ainsi traités succombent à une cachexie chronique.

Roux et Chamberland ont conféré l'immunité aux cobayes en leur injectant à sept ou huit reprises 1 centimètre cube de sérosité d'œdème septique filtrée sur la bougie de porcelaine.

Nous avons réussi à immuniser le lapin par des inoculations répétées de sérosité septique entière dans le tissu cellulaire de l'oreille; la première fois, on inocule un dixième à un cinquième de goutte à l'extrême pointe de l'oreille, il se produit une vive réaction, la partie inoculée prend un aspect érysipélateux; on répète les inoculations tous les huit ou dix jours en portant successivement les doses à un quart, une demie et une goutte et en se rapprochant chaque fois de la base de l'oreille. Au bout de cinq à sept semaines l'animal peut recevoir une goutte de sérosité virulente sous la peau de l'abdomen; on renforce l'immunité par des injections successives dans le tissu cellulaire du tronc; quand on arrive à injecter de fortes doses, il n'est pas rare de voir se produire des abcès où la phagocytose est intense et qui abou-

tissent à la guérison. L'immunité ainsi acquise est très solide et peut être transmise héréditairement par la mère.

§ 4. — SÉROTHÉRAPIE.

Leclainche a obtenu un sérum très actif en pratiquant chez l'âne, animal peu sensible, des inoculations intraveineuses, puis intramusculaires multiples de sérosité virulente.

Un mélange de 2 centimètres cubes de ce sérum et de 5 gouttes de sérosité septique ne produit aucun accident quand on l'inocule au cobaye. Les animaux ainsi traités ne présentent par la suite aucune immunité et succombent aussi vite que les témoins aux inoculations d'épreuve.

Le sérum antigangreneux est sans action sur le virus du charbon symptomatique (Voy. p. 272).

Agglutination. — Le sérum de Leclainche agglutine en quelques minutes les cultures jeunes de vibrion en bouillon Martin. Cette action agglutinante se produit aux dilutions de 1 p. 30 à 1 p. 30000; elle est plus marquée au contact qu'à l'abri de l'air. Le Bacille du charbon symptomatique n'est pas agglutiné par le sérum antigangreneux.

CHAPITRE III

LE BACILLE DU CHARBON SYMPTOMATIQUE

Le Bacille du charbon symptomatique, *Bacillus Chauvæi*, a été découvert par Arloing, Cornevin et Thomas.

Le charbon symptomatique, ou charbon bactérien, sévit sur les bovidés âgés de quatre ou cinq mois à quatre ou cinq ans ; pendant les premiers mois de la vie et après cinq ans les bovidés ne sont pas réceptifs. Le mouton et la chèvre sont rarement atteints ; les autres animaux ne prennent pas le charbon symptomatique spontané.

Le virus se conserve dans le sol, il s'inocule au bœuf par la peau, la trachée et probablement les voies digestives (Arloing). L'épizootie sévit de préférence en été et dans certaines régions : Velay, Auvergne, Pyrénées, Haute-Marne, Suisse, etc. ; presque toujours mortelle, elle cause de grands ravages dans les troupeaux.

Le charbon symptomatique a les allures d'une septicémie ; l'animal a de la fièvre, de l'inappétence, il ne rumine plus, est triste, puis apparaissent une ou plusieurs tumeurs sur les membres, dans l'auge, à la gorge, sur le thorax, aux testicules ; le plus souvent la tumeur siège dans les muscles, elle progresse rapidement, devient énorme, sonore, crépitante au centre ; d'abord douloureuse, elle devient indolore ; l'œdème périphérique s'accroît et l'animal meurt après trois à cinq jours de maladie.

Article I. — CHARBON SYMPTOMATIQUE EXPÉRIMENTAL.

§ 1er. — ANIMAUX RÉCEPTIFS.

Le cobaye, le bœuf, le mouton sont très réceptifs, la chèvre est moins sensible. L'âne et le cheval présentent un œdème douloureux au point d'inoculation, mais guérissent rapidement.

Le lapin est réfractaire, mais son immunité peut être vaincue aisément (Roger).

Il suffit d'inoculer en même temps que le bacille un peu d'acide lactique ou d'une culture de *Micrococcus prodigiosus*, ou encore de traumatiser fortement le lieu de l'injection, pour vaincre la résistance des tissus de l'organisme, entraver la phagocytose et voir se développer la septicémie. Leclainche et Vallée ont obtenu des cultures très virulentes dont l'injection sous-cutanée tue le lapin à la dose de 3 centimètres cubes.

La souris, le rat, le chien, le chat, le porc, les oiseaux sont réfractaires (1).

§ 2. — PRATIQUE DES INOCULATIONS.

Le Bacille de Chauveau étant strictement anaérobie, comme le Vibrion septique, ne se développe qu'à la condition d'être inoculé profondément dans les tissus; il n'infecte pas les plaies superficielles.

L'influence du lieu d'inoculation est grande. Une dose de virus dont l'injection dans le tissu cellulaire du corps tue le bœuf, confère à cet animal une maladie bénigne si elle est inoculée dans le tissu conjonctif du toupillon ; mais dans ce dernier cas, si on réchauffe la partie inoculée, le bacille se développe et la mort peut survenir.

L'influence de la température est encore prouvée par ce fait que la grenouille, dans les conditions normales, résiste au bacille, tandis qu'elle succombe au charbon si, après l'inoculation, on la place dans l'étuve à 25°.

L'inoculation d'un virus actif dans les veines du bœuf produit simplement un mouvement fébrile de peu de durée, mais si, pendant l'inoculation, une trace de virus tombe dans les tissus périveineux, le charbon éclate et se termine par la mort. On peut aussi amener le développement de l'infection en produisant une rupture vasculaire après l'injection intraveineuse (Arloing).

On peut conférer le charbon symptomatique par divers procédés :

I. *Inoculation d'une culture.* — Ce moyen, peu sûr avec les cultures ordinaires, confère aisément le charbon si l'on s'adresse à une culture jeune en bouillon de Martin (Voy. p. 31), dont 3 ou 4 gouttes inoculées sous la peau tuent un cobaye de 500 grammes en dix-huit ou vingt-quatre heures (Leclainche et Vallée).

II. *Inoculation du sang charbonneux.* — On prélève du sang dans le cœur d'un cobaye ou d'un mouton récemment morts du charbon ; ce sang, enfermé dans des ampoules scellées, est placé quarante-huit heures à l'étuve; il peut alors être inoculé.

III. *Inoculation de sérosité.* — Procédé recommandé. — Le suc de la tumeur peut être inoculé à l'état frais; pour cela on broye un fragment de tumeur avec de l'eau stérile et on injecte le liquide obtenu. On peut utiliser le suc desséché, *poudre d'Arloing*, dont nous

(1) On a parfois essayé de confondre le Vibrion septique et le *B. Chauvæi*; cette confusion ne saurait plus être admise aujourd'hui. Outre les nombreuses différences que nous signalerons entre les deux microbes, nous ferons remarquer dès à présent que tous les animaux que nous venons d'énumérer comme réfractaires au charbon symptomatique sont réceptifs pour le Vibrion septique.

indiquerons plus loin la préparation; dans ce cas on ajoute une trace d'acide lactique à un peu de poudre broyée et délayée dans quelques gouttes d'eau stérile.

IV. *Inoculation de spores pures.* — En appliquant des procédés analogues à ceux que nous avons décrits à propos du Vibrion septique, Leclainche et Vallée ont montré que l'inoculation de spores pures, dépourvues de toxine, n'entraîne pas la mort des animaux d'expérience ; mais, comme celles du Vibrion, les spores germent et tuent l'animal inoculé si elles sont protégées contre les phagocytes ; certaines substances, certaines bactéries (Staphylocoque doré, etc.) jouent le rôle de *favorisants* et permettent la germination des spores et l'infection.

§ 3. — SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

Nous prendrons comme type la maladie expérimentale du cobaye.

Après inoculation dans les muscles de la cuisse on voit bientôt se produire un gonflement douloureux, on assiste au développement d'une tumeur charbonneuse caractéristique entourée d'une zone d'infiltration œdémateuse qui s'étend rapidement à la paroi abdominale. L'animal se met en boule, reste immobile, ses poils sont ternes, hérissés, s'arrachent facilement sur les régions œdématiées, il pousse des cris quand on veut le saisir. La mort survient dans les deux ou trois jours qui suivent l'inoculation.

A l'*autopsie* on ne constate guère que des lésions locales. Au point inoculé s'est développée la tumeur : le tissu conjonctif est infiltré par une sérosité rosée, riche en globules rouges ; les muscles présentent une coloration jaunâtre ou rouge sombre, leurs fibres sont altérées, vitreuses, dissociées; le centre de la tumeur est noir, sanieux et renferme des bulles de gaz. Les lésions exhalent une odeur spéciale, comparée par Arloing à celle du beurre rance ; le bacille y abonde. Autour de la tumeur l'œdème s'étend plus ou moins loin et envahit les parois abdominales et thoraciques ; la sérosité de l'œdème est riche en bacilles mais ne renferme pas de leucocytes. Les ganglions de l'aine sont tuméfiés et œdématiés. Dans la cavité péritonéale on trouve une petite quantité d'une sérosité à peine louche contenant de nombreux bacilles ; l'intestin est fréquemment congestionné. L'aspect du sang est peu modifié : pendant la vie, le microscope n'y décèle pas de bacilles; après la mort ceux-ci apparaissent, mais sont toujours peu nombreux même après séjour du sang à l'étuve à 37°.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le *Bacillus Chauvæi* se présente sous la forme de bâtonnets longs de 3 à 8 μ, larges de 1 μ environ, isolés ou réunis par deux. On ne trouve jamais, ni dans les cultures, ni dans l'organisme, les longues chaînettes que nous avons décrites chez le Vibrion septique ; ce dernier microbe est beaucoup plus fin, plus flexueux et plus long que le *B. Chauvæi* qui est droit et rigide. Les extrémités du *B. Chauvæi* sont coupées nettes, carrément. Il est mobile, moins cependant que le Vibrion ; sa mobilité ne se manifeste qu'en l'absence de l'air, au centre de la préparation.



Fig. 143. — Charbon symptomatique. — Frottis de muscle. Fuchsine de Ziehl diluée (Reich. ; Obj., 1/12 imm. ; Oc. II).

Dans les tumeurs musculaires il se forme rapidement des *spores* ; elles peuvent cependant manquer quand l'animal est mort très rapidement. La spore se présente comme un point ovoïde, réfringent, ne prenant pas les couleurs d'aniline en solution aqueuse à froid ; elle siège soit à une extrémité, soit au centre du bâtonnet, donnant des formes en raquette et en battant de cloche. — La sérosité œdémateuse qui entoure les tumeurs ne contient pas d'ordinaire de spores ; on n'en rencontre jamais dans les épanchements des séreuses. Dans les cultures, enfin, se trouvent des bacilles et des spores.

Les dimensions relativement grandes du bacille rendent aisé son examen sans coloration.

Coloration. — Le *B. Chauvæi* se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline en solutions mordancées. Il se colore par la méthode de Gram ; comme pour le Vibrion septique, l'opération ne réussit que si l'on fait agir énergiquement la solution colorante avant le contact avec la liqueur iodée. Il se colore également par la méthode de Claudius.

Les *spores* se colorent par les procédés ordinaires (Voy. p. 148).

a. *Cultures.* — Employer de préférence le krystall violet phéniqué ou la fuchsine de Ziehl diluée.

b. *Frottis.* — Les préparer avec des parcelles de la tumeur ou étendre sur les lamelles de la sérosité œdémateuse ou péritonéale, ou frotter légèrement les lamelles sur la surface du foie d'un cobaye mort du charbon. Colorer comme il est dit plus haut (krystall violet, méthodes de Gram et de Claudius).

c. *Coupes.* — Porteront sur la tumeur charbonneuse et seront traitées de préférence par le bleu phéniqué de Kühne ou la double coloration de Gram.

Remarque. — Dans les cadavres charbonneux il se produit rapidement une invasion du Vibrion septique contenu normalement dans l'intestin : le vibrion se distingue du Bacille de Chauveau par sa forme allongée.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le *B. Chauvæi* est un anaérobie strict; on le cultive suivant les méthodes exposées précédemment. Les milieux ordinaires donnent des cultures grêles. Le bouillon ordinaire convient mal ; on a proposé de l'additionner de glycérine (4 p. 100), de glucose (1 p. 100), de sulfate de fer (1 p. 100), etc. : ces additions n'ont aucun avantage (Kitasato). Leclainche et Vallée ont obtenu des résultats excellents en employant le bouillon de Martin. Les cultures donnent un abondant dégagement de gaz (H, CO^2, CH^n) avec odeur butyrique spéciale. Le développement commence à partir de + 15° ; la température optima est aux environs de 37°.

Pour la recherche du bacille les cultures sont ensemencées avec un peu de suc de la tumeur, de sérosité péritonéale, ou de sang du cœur.

Impuretés des cultures. — Il est assez difficile d'obtenir des cultures pures du *B. Chauvæi.* Dans la pulpe des tumeurs, le bacille est presque toujours associé à des microbes étrangers (aérobies facultatifs, Vibrion septique). Au laboratoire on conserve la virulence du bacille par des passages de cobaye à cobaye : l'infection symptomatique favorise à un haut degré l'infection par le Vibrion septique et après quelques passages les animaux meurent septiques et charbonneux. Aussi de temps en temps faut-il vérifier la culture par l'examen microscopique et en inoculant simultanément un lapin et un cobaye. Si le cobaye seul est tué, le virus est pur et on ensemence 4 ou 5 gouttes du sang du cœur aussitôt après la mort : on obtient ainsi une culture dont on est sûr.

Bouillon. — Préférablement au bouillon ordinaire on emploiera le bouillon de Martin. A 37° un trouble général apparaît vers la vingtième heure ; il se dégage des gaz en abondance. Au bout de deux ou trois jours il se forme des flocons qui précipitent et le bouillon s'éclaircit peu à peu.

Milieux albumineux. — La culture est plus abondante et conserve plus longtemps sa virulence que dans le bouillon. On peut employer le sérum pur ou coupé de 2 à 3 parties d'eau stérile, ou le jus de viande dont nous avons indiqué la préparation à propos du Vibrion septique.

Gélatine. — *Piqûre profonde.* — A 20° il se développe lentement le long de la piqûre de petites sphères irrégulières qui émettent des prolongements radiés; quand elles commencent à confluer, la gélatine est disloquée par les gaz; la culture s'étend irrégulièrement et liquéfie la gélatine.

Colonies isolées. — A l'intérieur de la gélatine apparaissent de petites sphères blanchâtres émettant des prolongements radiés, puis devenant nuageuses, irrégulières et liquéfiant le milieu avec production de gaz.

Gélose. — *Piqûre profonde.* — A 37° développement rapide d'une ligne blanchâtre, nuageuse le long de la piqûre, puis fragmentation de la gélose par les gaz et envahissement des crevasses par la culture.

Pomme de terre. — Pas de culture apparente.

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Le *B. Chauvæi* a une vitalité considérable; grâce à ses spores, il résiste aux causes ordinaires de destruction des microbes. Dans la sérosité musculaire desséchée le bacille sporulé n'est tué que par une exposition de plusieurs heures à 110° (chaleur humide). Les solutions antiseptiques usuelles, la putréfaction sont sans action sur les spores.

La virulence du bacille disparaît assez rapidement dans les cultures : on ne peut plus tuer le cobaye après cinq ou six passages en bouillon; les agents physiques détruisent facilement la virulence des cultures; celles-ci deviennent inactives après une exposition à 100° pendant deux minutes; les cultures en sérum résistent mieux que celles en bouillon.

Dans la sérosité des tumeurs desséchée, au contraire, la virulence persiste aussi énergiquement que la vitalité. Cette sérosité desséchée à 35° reste active pendant des années et peut supporter des températures élevées pendant plusieurs heures; nous reviendrons sur ces faits à propos des vaccinations.

Dans l'organisme vivant le bacille est susceptible de conserver longtemps son activité : une grenouille inoculée et restée indemne, prend le charbon symptomatique si on la met à l'étuve à 25°, quinze et même vingt jours après l'inoculation (Arloing).

§ 2. — VACCINATION.

Le charbon symptomatique ne récidive pas : une atteinte non mortelle confère l'immunité.

I. — L'injection de virus dans le système veineux, inoffensive si elle est faite correctement, rend les animaux réfractaires, mais les difficultés et les dangers inhérents à cette méthode en interdisent l'emploi comme procédé pratique de vaccination.

II. — Nous avons appris que l'inoculation au toupillon présente peu de dangers; cette particularité, jointe à la découverte des virus atténués, a permis à Arloing, Cornevin et Thomas de créer la vaccination anticharbonneuse. Le virus atténué est obtenu en exposant à l'action de la chaleur la sérosité musculaire desséchée ; voici la technique de la préparation :

Les muscles malades d'un bœuf ou d'un mouton morts de charbon symptomatique sont hachés finement et additionnés des deux tiers de leur poids d'eau stérilisée. On broie le tout au mortier puis on passe sur une toile propre.

Le suc musculaire obtenu est étalé sur des plateaux de porcelaine et exposé, jusqu'à dessiccation complète, à l'étuve sèche à 35°. L'extrait sec obtenu est passé au moulin à poivre, puis au mortier jusqu'à réduction en poudre très fine. On obtient ainsi un produit très-virulent pouvant garder son activité pendant des années.

Pour l'atténuation on mélange avec 2 parties d'eau stérile un lot de la poudre obtenue, on étale le mélange en couche mince et on le chauffe lentement jusqu'à 100°-105°; on le maintient cinq à six heures à cette température. Tel est le premier vaccin dont l'inoculation ne produit plus d'effets nuisibles.

Le second lot de la poudre virulente est également humecté et maintenu pendant cinq à six heures à 90°-94° seulement. Il fournit le deuxième vaccin beaucoup plus actif que le premier et qu'il pourrait être dangereux d'injecter de prime abord.

Pour pratiquer la vaccination on broie finement au mortier une petite quantité de premier vaccin, puis on y ajoute quelques gouttes d'eau stérile, on passe le mélange sur un linge fin préalablement bouilli et on injecte le produit obtenu au toupillon ou à la pointe de l'oreille. Au bout de quelques jours on renforce l'immunité en inoculant de même le deuxième vaccin.

L'immunité obtenue est très solide, les accidents sont rares; si la réaction est trop violente, ce qui n'arrive pas quand l'inoculation a été bien faite, on coupe la queue de l'animal, supprimant ainsi le foyer d'infection. Aujourd'hui ce procédé de vaccination est très répandu en France et en Suisse.

Les poudres vaccinales d'Arloing reprennent toute leur virulence par

l'addition d'un peu d'acide lactique : l'acide cause un petit foyer de nécrose, entrave la résistance des phagocytes et permet le développement du germe. L'alcool, le traumatisme, certaines toxines microbiennes agissent de même. D'ailleurs, dans les poudres d'Arloing, le germe n'a pas subi une atténuation à proprement dire ; le virus est modifié en ce sens que sa germination est retardée et que l'organisme a le temps de se défendre contre lui par la phagocytose : la preuve en est fournie par ce fait que l'ensemencement d'un peu de poudre donne une culture virulente.

Les poudres d'Arloing contiennent de nombreuses impuretés : les microbes étrangers abondent dans la tumeur, ce sont eux qui causent les très rares accidents observés au cours des vaccinations. Léclainche et Vallée ont indiqué un procédé permettant d'obtenir le vaccin pur nécessaire pour les recherches de laboratoire :

Recueillir le sang du cœur d'un cobaye ou d'un mouton mort du charbon symptomatique ; l'enfermer dans des ampoules scellées et porter celles-ci pendant quarante-huit heures à l'étuve à 37° ; étendre alors leur contenu en couche mince dans des boîtes de Petri stériles et les placer quelques heures à l'étuve à 37° jusqu'à dessiccation complète. Le sang desséché est broyé, réduit en poudre et trituré avec un volume d'eau ; la pâte obtenue est étalée en couche mince sur des plaques de verre qui sont chauffées à l'air chaud, les unes pendant sept heures à 102° (*premier vaccin*), les autres pendant sept heures à 92° (*deuxième vaccin*). Les vaccins sont pulvérisés, conservés en tubes stériles et utilisés comme les poudres d'Arloing.

Remarque. — Les vaccins purs se comportent comme les spores pures, ils sont dépourvus de toxine, ne tuent pas les animaux (doses modérées), néanmoins ils vaccinent, tandis que les cultures chauffées à 80° pendant trois heures (spores pures) ne vaccinent pas. Dans ce dernier cas les spores sont détruites par les phagocytes, immédiatement après l'injection ; avec le vaccin, au contraire, l'état physique de la matière inoculée retarde un peu la phagocytose, la destruction des spores est assez retardée pour qu'une élaboration vaccinale se produise.

III. — Kitasato, Kitt, ont signalé que les cultures en bouillon âgées de plus de quinze jours ne tuent pas le cobaye et lui confèrent l'immunité ; les cultures virulentes chauffées à 80° pendant trente minutes agissent semblablement ; les mêmes cultures chauffées à 80° pendant trois heures ne vaccinent pas.

Leclainche et Vallée ont montré que les cultures virulentes chauffées à 70° pendant deux heures ne tuent plus le cobaye jeune, mais restent actives pour le cobaye adulte ; 1 centimètre cube d'une culture ainsi traitée confère au jeune cobaye une immunité solide ; 2 centimètres cubes injectés en arrière de l'épaule donnent aux bovidés des troubles insignifiants et une immunité solide ; une deuxième injection faite au bout de sept jours complète la vaccination.

Sur ces faits Leclainche et Vallée ont basé un mode de vaccination dont voici la technique :

Faire des cultures pures en bouillon de Martin; au bout de cinq à huit jours les répartir dans des ampoules de verre scellées qui sont portées pendant deux heures au bain-marie à 70°; on obtient ainsi le premier vaccin. Le deuxième vaccin est fourni par la culture même, non chauffée, répartie en ampoules scellées. Ce procédé supprime toute manipulation des vaccins pulvérulents et il donne un produit dont le dosage est facile.

Remarque. — *Les animaux vaccinés contre le charbon symptomatique avec des vaccins purs ne présentent jamais d'immunité vis-à-vis du Vibrion septique* (1) (Leclainche et Vallée).

§ 3. — TOXINE.

I. — Roux a constaté que les cultures en bouillon stérilisées par filtration sur porcelaine ou chauffage à 115° renferment des produits solubles peu toxiques, doués de propriétés vaccinales. En injectant à des cobayes par trois fois et à deux jours d'intervalle des doses de 40 centimètres cubes de cultures stérilisées, Roux a conféré l'immunité à ces animaux.

II. — Leclainche et Vallée ont repris l'étude de la toxine symptomatique. En bouillon de Martin, le Bacille de Chauveau donne une toxine très active; le maximum de toxicité de la culture est atteint vers le cinquième jour, puis décroît. Les cultures simplement décantées tuent les animaux avec une rapidité telle que le bacille n'a pas le temps de se développer : l'injection dans les hémisphères cérébraux de 3 à 4 gouttes d'une telle culture tue le cobaye en quelques heures; 2 à 5 centimètres cubes injectés dans la veine auriculaire tuent le lapin en un temps qui varie de cinq minutes à cinq heures; un cheval a succombé en six minutes à l'injection de 10 centimètres cubes dans la jugulaire.

La toxine est altérée par l'air; une large aération la détruit en quarante-huit heures. Elle n'est pas détruite par le chauffage à 115°; le chauffage à 70°-75° modifie ses propriétés chimiotaxiques qui, de négatives, deviennent positives.

Les filtres retiennent une grande partie du poison; cependant la culture filtrée peut encore tuer les animaux d'expérience : le cobaye succombe en quelques heures à l'inoculation intrapéritonéale de 5 centimètres cubes; avec des doses plus faibles l'intoxication évolue en sept à neuf jours et l'animal meurt de cachexie.

(1) Roux et Chamberland avaient vu les cobayes rendus réfractaires au charbon résister souvent au Vibrion septique. Duenschmann, ayant obtenu un sérum actif contre le charbon, le vit neutraliser des doses mortelles de Vibrion septique. Ces résultats étaient dus à l'impureté des cultures vaccinales employées par les auteurs : ils immunisaient à la fois contre les deux affections.

§ 4. — SÉROTHÉRAPIE.

I. — Kitt fait les premiers essais de sérothérapie du charbon symptomatique. Il s'adresse au mouton et au cheval ; ces animaux reçoivent d'abord dans une veine, puis sous la peau, du virus symptomatique ; leur sérum, injecté sous la peau à la dose de 5 à 10 centimètres cubes, préserve le mouton contre l'inoculation virulente pratiquée trois à huit jours plus tard.

II. — Duenschmann renforce la résistance naturelle du lapin par des doses croissantes de virus symptomatique ; il obtient ainsi un sérum antitoxique et préventif pour le cobaye, quand il est administré isolément, avant ou en même temps que le virus, ou bien encore mélangé à ce dernier. Ce sérum est dépourvu de pouvoir curatif.

III. — Arloing constate des propriétés préventives, curatives et antitoxiques dans le sang d'une génisse immunisée, préparée pendant six mois par l'inoculation de doses croissantes de virus, et ayant résisté à des inoculations de très fortes quantités de suc charbonneux dans le sang et le tissu conjonctif.

Le sérum d'Arloing neutralise *in vitro* le double de son poids de virus actif frais, le mélange peut être impunément inoculé au mouton.

Introduit isolément dans le tissu conjonctif à la dose de 10 centimètres cubes, il préserve un mouton de 30 kilos contre l'inoculation d'une dose mortelle de virus frais inoculée en même temps en un autre point de l'organisme ; injecté dans une veine, il donne le même résultat à une dose dix fois plus petite.

L'immunité créée par le sérum est éphémère : présente encore au quatrième jour, elle a toujours disparu le huitième jour ; elle est transformée en une immunité active beaucoup plus durable si on fait suivre l'injection de sérum de l'inoculation d'une dose ordinairement mortelle de virus frais.

L'injection du mélange sérum-virus, bien supportée par les animaux, est impuissante à conférer une immunité appréciable ; les animaux ainsi traités résistent un peu plus longtemps que les animaux témoins à l'inoculation d'épreuve, mais finissent par succomber.

L'injection sous-cutanée d'une dose de sérum largement préventive arrête la marche d'une inoculation mortelle si elle est pratiquée moins de trois heures après cette dernière ; par voie sanguine, la même dose est curative neuf heures après l'infection et inefficace au bout de douze heures.

Les propriétés du sérum semblent se conserver intactes quand on dessèche celui-ci rapidement, à l'air libre, en couche mince et à la température de 38°.

IV. — Leclainche et Vallée obtiennent un sérum actif en immunisant la chèvre et le cheval.

a. *Chèvre.* — L'animal reçoit une inoculation intraveineuse virulente, puis, à dix jours d'intervalle, des inoculations sous-cutanées de 5, 10 et 15 centimètres cubes de macérations filtrées, préparées en broyant parties égales d'eau et de muscles de cobayes infectés.

Dès la deuxième inoculation sous-cutanée, le sérum de la chèvre traitée, injecté à la dose de 1 à 5 centimètres cubes, préserve le cobaye contre l'inoculation de 1/2 centimètre cube de macération virulente, à la condition que l'inoculation d'épreuve soit pratiquée un à trois jours après l'injection de sérum.

Le mélange de sérum et de virus est inoffensif.

L'injection de sérum faite en même temps que l'inoculation virulente, mais en un point différent, ne protège pas le cobaye; il en est de même quand le sérum est inoculé après le virus.

b. *Cheval.* — L'animal est préparé par des injections intraveineuses de 10 à 135 centimètres cubes de culture en bouillon de Martin. Son sérum, à la dose de 1 à 5 centimètres cubes, immunise le cobaye contre l'injection d'une goutte de jus virulent; l'état réfractaire ne paraît que douze heures après l'injection du sérum; l'immunité est peu durable (huit jours au plus).

Le mélange de 3 centimètres cubes de sérum avec 5 gouttes de culture est inoffensif; les cobayes ayant reçu ce mélange ne présentent qu'une immunité passagère (dix jours au plus). Le sérum n'a aucun effet thérapeutique chez le cobaye.

Agglutination. — Les sérums de Leclainche et Vallée ont un pouvoir agglutinant compris entre 1/30 et 1/6000. Le sérum de la vache atteinte du charbon symptomatique a un pouvoir agglutinant d'environ 1/300.

Le sérum des animaux sains n'agglutine le Bacille de Chauveau qu'à des dilutions inférieures à 1/12.

Le sérum antisymptomatique n'agglutine pas le Vibrion septique aux dilutions inférieures à 1/12; de même le sérum antigangreneux est sans action sur le Bacille du charbon symptomatique. *Ces sérums exercent une action rigoureusement spécifique* (Leclainche et Vallée).

CHAPITRE IV

LE BACILLE DU ROUGET DU PORC

Le rouget du porc (rougeole, érysipèle) est causé par un bacille découvert par Pasteur et Thuillier et dont la description définitive a été donnée par Löffler.

Le rouget est une maladie fort importante au point de vue économique ; il tue annuellement un grand nombre de porcs. Dans les porcheries atteintes, 50 p. 100 des animaux succombent; la maladie aiguë est presque toujours mortelle.

Les porcs contractent la maladie de six mois à deux ans ; plus jeunes, ils sont réfractaires ; plus vieux, ils sont rarement atteints. Les races sélectionnées, les races anglaises par exemple, sont les plus réceptives ; les races sauvages sont réfractaires.

Le porc s'inocule par les voies digestives en mangeant les excréments des animaux malades.

Bien que le porc soit à peu près le seul animal susceptible de contracter spontanément le rouget, on a vu parfois, dans les porcheries atteintes, des pigeons et des lapins prendre la maladie.

La viande des porcs suspects ou même morts du rouget est fréquemment livrée à la consommation sans qu'il en résulte d'inconvénients pour l'homme.

Le rouget peut être aigu ou chronique. Le *rouget aigu* est caractérisé par le développement, sur la peau, aux oreilles, au pourtour de l'anus et de la vulve, à la face interne des cuisses, au groin, de taches purpuriques rouges ou violacées. L'animal a de la diarrhée, il pousse des grognements plaintifs, reste couché et enfoui dans sa paille, porte la queue déroulée et pendante; la température s'élève, la mort survient au bout de quarante-huit à soixante-douze heures.

Dans le *rouget chronique*, l'évolution est moins bruyante et la guérison survient assez fréquemment. La tuméfaction des articulations donne une allure spéciale à l'affection (*goutte*); quand la maladie évolue vers la guérison, il se produit une desquamation au niveau des taches cutanées; il est fréquent que le porc ne revienne pas à la santé complète.

A l'autopsie des porcs morts du rouget on note, outre les taches cutanées, une congestion intense des séreuses et de l'intestin; les ganglions, particulièrement ceux de l'abdomen, sont tuméfiés et congestionnés. La rate est volumineuse, bosselée, diffluente. Le foie est congestionné, le sang

est noir. Plus rarement on trouve un épaississement des tuniques intestinales et des noyaux de broncho-pneumonie.

Les liquides diarrhéiques, la rate, les ganglions, la moelle osseuse et, à un plus faible degré, le sang, le foie et le rein renferment le bacille spécifique.

Article I. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

§ 1er. — ANIMAUX RÉCEPTIFS.

Le porc, le pigeon, la souris, le lapin, sont réceptifs, mais à des degrés différents. — Le cobaye est réfractaire.

Le pigeon et la souris succombent dans les trois ou quatre jours qui suivent l'injection virulente, sous-cutanée ou intrapéritonéale. Le lapin est plus résistant : pour le tuer, il faut pratiquer l'injection dans une veine.

Les inoculations en série chez le lapin exaltent la virulence du bacille pour cet animal, mais l'affaiblissent pour le porc. Pour arriver à ce résultat, on inocule le premier lapin par injection intraveineuse d'une culture provenant du porc; la rate de ce premier lapin sert à inoculer le second, etc.

Au contraire, la virulence du bacille s'accroît pour toutes les espèces réceptives quand on fait les passages en série chez le pigeon.

Le porc, enfin, est difficile à infecter; l'injection intraveineuse elle-même est rarement mortelle ; on arrive mieux à conférer la maladie par ingestion, encore faut-il s'adresser à des individus de races perfectionnées.

§ 2. — PRATIQUE DES INOCULATIONS.

Opérer suivant les règles générales en se rapportant à ce que nous venons de dire. La matière d'inoculation peut être fournie directement par la rate, les ganglions ou le sang d'un animal mort du rouget, mais il sera toujours préférable d'ensemencer avec une parcelle de rate un tube de bouillon et d'inoculer un peu de la culture obtenue au bout de trente-six à quarante-huit heures.

§ 3. — SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

Pour les *symptômes*, Voy. plus haut.

La lésion dominante du rouget inoculé est la tuméfaction et le ramollissement de la rate. On recherche la présence du bacille dans la rate, la moelle osseuse, les ganglions et le sang, de préférence, puis dans le foie et les reins. Les coupes seront pratiquées sur les ganglions, la rate, le foie et les reins.

§ 4. — RECHERCHE ET DIAGNOSTIC DU ROUGET.

Le diagnostic du rouget présente un intérêt capital au point de vue des vaccinations ; la recherche du bacille spécifique est d'un

grand secours pour ce diagnostic (distinction avec le *hog-choléra*). On aura recours aux procédés suivants :

1° Préparation de lamelles de sang et de frottis de pulpes splénique, médullaire, ganglionnaire; constatation de la présence du bacille avec ses caractères morphologiques dans ces frottis ;

2° Ensemencement de pulpe de rate en bouillon et sur gélatine;

3° Inoculations de la culture en bouillon au pigeon et au cobaye. Ce dernier animal, réfractaire au rouget, prend au contraire très facilement le hog-choléra.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le microbe du rouget est un petit bacille fin, immobile, difficilement visible sans coloration, mesurant de 0,5 à 1,5 μ de long sur 0,2 à 0,3 μ de large, isolé, réuni par deux ou en amas dans le sang et les pulpes d'organes, formant de courtes chaînettes dans les cultures en bouillon. Les bacilles sont plus abondants dans les ganglions et la rate que dans le sang, ils se rencontrent fréquemment inclus dans les leucocytes ; dans les coupes, on les voit former des amas à l'intérieur des vaisseaux capillaires.



Fig. 144. — Bacille du rouget du porc. — Culture en bouillon. — Thionine phéniquée (Reich. Obj. 1/12 im. ; Oc. IV).

On ne leur connaît pas de spores.

Coloration. — Le Bacille du rouget se colore bien par les couleurs basiques d'aniline. Il prend le Gram et le Claudius. On utilisera de préférence les procédés suivants :

a. *Cultures.* — Colorer avec la thionine phéniquée ou la solution de Ziehl diluée.

b. *Frottis, lamelles de sang.* — On peut en faire la coloration simple avec la thionine ou le bleu de méthylène phéniqués ; il est préférable d'employer la méthode de Gram.

c. *Coupes.* — Doivent être colorées par la méthode de Gram avec double ou triple coloration (picrocarmin de Orth et krystall violet phéniqué) (Voy. p. 228).

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Bacille du rouget est un aérobie indifférent; il pousse plus abondamment à l'abri de l'air. Il se développe aisément de + 15° à 40° dans les milieux usuels. Ses cultures restent toujours assez grêles. Les ensemencements seront pratiqués avec le sang, les pulpes d'organes ou la moelle osseuse d'un animal récemment mort du rouget.

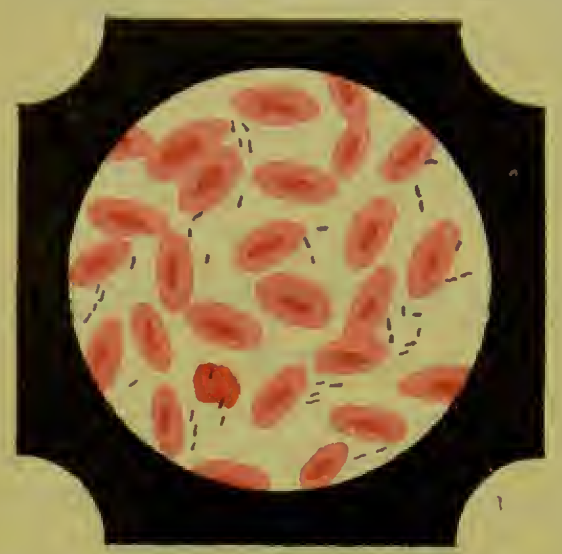


Fig. 145. — Rouget du porc. — Sang de pigeon. — Méthode de Gram (Reich. ; Obj. 1/12 im.; Oc. III).

Bouillon. — A 33°-38°, apparition rapide d'une opalescence légère; la culture reste peu abondante; elle est terminée vers le quatrième jour, et par la suite il se forme un très fin précipité blanc.

Gélatine. — *Piqûre.* — Culture caractéristique : le long de la piqûre se développe une ligne opaque grêle de laquelle émergent de nombreux petits filaments radiés, ramifiés, très délicats. La culture est plus abondante dans la profondeur. Vers le vingtième jour l'aspect caractéristique s'efface, la culture devient nuageuse. Il n'y a jamais liquéfaction de la gélatine (fig. 146).

Strie. — Développement rayonné ayant l'aspect d'une barbe de plume très fine.

Colonies isolées. — Fins flocons duveteux inclus dans la gélatine et émettant de minces prolongements radiés, puis l'aspect devient flou et le centre de la colonie forme une petite tache brunâtre.

Gélose. — La strie a d'abord la même apparence que sur gélatine, mais elle prend bientôt un aspect homogène et forme un revêtement mince et étroit.

Pomme de terre. — Le bacille ne s'y développe qu'à l'abri de l'air; la culture forme une strie à peine visible.

ARTICLE III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Le Bacille du rouget vit pendant plusieurs mois dans les cultures anaérobies. Il se conserve également bien dans les cultures pro-

fondes en tube de gélatine ordinaire et est susceptible d'être réensemencé et même de tuer le pigeon après six mois.

Dans les cultures aérobies en bouillon conservées à l'étuve à 37°-39°, sa virulence et même sa vitalité disparaissent beaucoup plus rapidement; la virulence s'atténue peu à peu et au bout d'une vingtaine de jours la culture est inoffensive. Nous avons vu qu'on pouvait restituer sa virulence à un virus atténué par des passages en série chez le pigeon.



Fig. 146. — Bacille du rouget du porc. — Piqûre en gélatine (8e jour).

§ 2. — VACCINATION.

Le porc guéri du rouget ne prend plus la maladie, la *goutte* préserve l'animal de l'infection aiguë. Pasteur et Thuillier ont pensé à conférer l'immunité aux animaux par l'inoculation de virus atténués ; la vaccination porcine est aujourd'hui très répandue, particulièrement en Autriche.

Il existe plusieurs procédés pour atténuer le virus ; on peut utiliser les cultures en bouillon atténuées par un séjour plus ou moins prolongé à l'étuve (action de l'oxygène de l'air). Le porc est inoculé d'abord avec un virus très affaibli, puis avec un deuxième vaccin ayant séjourné moins longtemps à l'étuve et par conséquent plus énergique ; le jeune porc étant peu sensible au virus, on pratique l'inoculation avant le quatrième mois, l'immunité obtenue dure un an environ, temps suffisant pour l'engraissage ; si on conserve le porc comme reproducteur, il est bon de pratiquer une nouvelle vaccination au bout d'un an.

Comme nous l'avons dit plus haut, le bacille peut encore être atténué par des passages en série chez le lapin. Après quelques passages, le virus, devenu très actif pour le lapin, est atténué pour le porc et peut être inoculé comme vaccin ; on utilise pour la vaccination une culture en bouillon ensemencée avec la rate du dernier lapin de la série.

§ 3. — PRODUITS SOLUBLES. — SÉROTHÉRAPIE.

L'injection de cultures filtrées ne donne aucun résultat : les cultures restant toujours très grêles, les toxines ne s'y rencontrent qu'en quantité inappréciable. Mais si l'on inocule sous la peau du

lapin de petites quantités de cultures, l'animal se rétablit rapidement et on peut bientôt lui injecter dans les veines de fortes doses de virus sans que sa santé en soit altérée ; tuant un lapin ainsi préparé et faisant un extrait en broyant et pressant ses muscles et ses viscères, Emmerich, Leclainche, etc., ont obtènu un produit qui, après filtration, a des propriétés vaccinales et thérapeutiques.

Mesnil a repris l'étude de la sérothérapie du rouget. Il immunise le lapin par la méthode pasteurienne des virus atténués. A sept jours d'intervalle il injecte 1/4 de centimètre cube, puis 1 centimètre cube de premier vaccin; il continue par le second vaccin aux doses de 1/4 de centimètre cube, puis 1 centimètre cube. Alors seulement, à des dates éloignées d'une semaine à un mois, il donne progressivement 1/4, 1, 3, 4, 5, 10 centimètres cubes de culture. L'immunisation exige environ six mois de traitement et, malgré les faibles doses employées, quelques animaux succombent; ce n'est que vers le troisième mois que les sujets peuvent recevoir tous les huit ou dix jours une forte dose de culture sans réagir notablement. Le sérum des animaux ainsi préparés protège, à la dose de $0^{cc},05$, la souris contre l'inoculation faite le lendemain; à la dose de $0^{cc},25$, il est curatif pourvu que l'on intervienne moins de vingt-quatre heures après l'infection. Ce sérum se montre actif pour le pigeon et le lapin. Il n'est pas bactéricide : le Bacille du rouget y pousse en longues chaînettes et y conserve sa virulence. Il possède la propriété agglutinante vis-à-vis du bacille.

BACILLE DE LA SEPTICÉMIE DES SOURIS (KOCH).

La septicémie étudiée par Koch chez la souris domestique (*Mus musculus*) est produite par un petit bacille analogue à celui du rouget du porc. Ce bacille est sans action sur la souris des champs (*Arvicola arvalis*). Inoculé à la souris domestique, il la tue un peu moins vite que ne le fait le Bacille du rouget. Il n'est pathogène ni pour le pigeon, ni pour le lapin ; cependant, en renforçant sa virulence par de nombreux passages en série chez la souris, on obtient un virus qui, par inoculation intraveineuse, confère une maladie mortelle au pigeon.

La souris inoculée présente de la somnolence, ses paupières sont agglutinées, sa respiration haletante, enfin la mort arrive. Dans le sang, la pulpe des organes, on trouve de nombreux bacilles.

L'aspect morphologique, les réactions colorantes sont communes aux Bacilles de la septicémie et du rouget. Les cultures des deux microbes se ressemblent fort; cependant, pour le Bacille de la septicémie la culture en gélatine est plus nuageuse, présente moins nettement les prolongements radiés.

CHAPITRE V

LE BACILLE DU CHOLÉRA DES POULES

Le Bacille du choléra des poules, entrevu par Moritz, Perroncito, Toussaint, a été décrit par Pasteur.

Le choléra des poules (septicémie, peste ou typhus des volailles) fait de grands ravages dans les basses-cours, sévissant sur les gallinacées (poules, faisans, pintades, dindons et pigeons) et les palmipèdes (canards, oies). Le lapin, bien qu'extrêmement réceptif, est assez rarement atteint par l'épizootie.

La marche de la maladie peut être rapide, foudroyante, mais d'ordinaire l'évolution est plus lente, les animaux succombent au bout de cinq à sept jours après avoir présenté de la tristesse, de la somnolence et de la diarrhée souvent sanguinolente ; la poule malade ne mange pas, a les ailes pendantes, les plumes ternes et hérissées, la crête noire. Vers la fin de l'épidémie, les cas deviennent moins graves et quelques animaux guérissent.

Les animaux s'infectent par les voies digestives en picorant sur le sol les aliments souillés par les déjections des sujets malades. Le bacille se rencontre dans le sang, les pulpes d'organes et le contenu intestinal.

Article I. — **MALADIE EXPÉRIMENTALE.**

§ 1er. — ANIMAUX RÉCEPTIFS.

Tous les oiseaux et en particulier les petits oiseaux (moineaux, etc.) sont très sensibles au virus du choléra des poules ; ils prennent la maladie soit par injection sous-cutanée, intrapéritonéale ou intraveineuse, soit par ingestion.

Le lapin est éminemment réceptif ; il succombe rapidement sans avoir le temps de présenter de la diarrhée, bien qu'à l'autopsie on trouve l'intestin rempli de matières liquides (ce fait explique la rareté de l'épizootie chez les lapins, les excréments étant le véhicule ordinaire du contage) ; le ventre se ballonne, le sang est noir, dissous, on observe de nombreuses suffusions sanguines et une pleurésie double.

La souris, le rat sont très réceptifs. Parmi les rongeurs sensibles

il faut encore citer le spermophile ; à l'instigation de Metchnikoff on a pu, avec le Bacille du choléra des poules, provoquer de véritables épidémies parmi ces animaux et en délivrer en partie la Russie méridionale qui en est infestée.

Le cobaye est assez résistant. L'inoculation d'une dose moyenne de culture virulente dans le tissu conjonctif n'entraîne pas la mort de cet animal et produit simplement un abcès à pus peu riche en microbes, mais virulent pour la poule ; cependant, le cobaye succombe à l'injection intrapéritonéale d'une culture virulente.

Le chien, le chat, l'homme ne sont pas réceptifs.

§ 2. — PRATIQUE DES INOCULATIONS.

1° *Injection.* — Avec les précautions ordinaires, injecter sous la peau, dans le péritoine ou dans le muscle pectoral des oiseaux, quelques gouttes d'une culture âgée de vingt à vingt-quatre heures ou de sang d'un animal récemment mort du choléra des poules.

2° *Ingestion.* — Arroser les aliments avec une culture virulente ou faire ingérer la culture suivant les procédés décrits page 188.

§ 3. — SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

Nous décrirons ces symptômes chez la poule, animal le plus fréquemment utilisé; nous avons signalé plus haut les particularités propres au lapin.

Quelques gouttes d'une culture virulente tuent la poule en douze à vingt heures. Dans les cas foudroyants, les symptômes sont à peu près nuls; si la survie est suffisante, on observe les mêmes troubles que dans la maladie spontanée : l'animal est chancelant, il se met en boule, les plumes se hérissent, la crête est noire, puis apparaît la diarrhée muqueuse ou sanguinolente en même temps que du jetage ; la poule tombe dans la somnolence et le coma et succombe après quelques secousses convulsives.

A l'*autopsie*, on constate au point d'inoculation une très petite quantité d'un œdème sanguinolent, riche en microbes. Si le virus inoculé était peu actif, l'œdème est plus marqué, et quand la maladie dure plusieurs jours, l'infiltration est gélatiniforme, la partie du pectoral avoisinant le point d'inoculation est tuméfiée, jaunâtre et peut même avoir un aspect lardacé : on se trouve en présence d'une véritable nécrose. Le sang est noir, se coagule mal, présente l'aspect du sang dissous et renferme en abondance le bacille pathogène. Le tissu cellulaire sous-cutané, les séreuses, le cerveau, les poumons

présentent des suffusions sanguines; les poumons contiennent des noyaux d'infiltration, le foie est volumineux, jaunâtre, friable, la rate est tuméfiée, ramollie; cependant ces dernières lésions ne sont pas constantes. Le péricarde renferme une sérosité limpide, parfois rosée ou gélatiniforme. Le même épanchement se rencontre dans les plèvres du lapin (la cavité pleurale n'existe pas chez les oiseaux). Les muscles, le cœur ne sont altérés que si la maladie a duré plusieurs jours: ils sont alors ramollis, jaunâtres, feuille morte. L'intestin présente des lésions d'entérite, la muqueuse a la teinte hortensia et est ulcérée de-ci, de-là ; le contenu intestinal est diarrhéique, quelquefois hémorragique. Suivant la règle générale, les lésions sont d'autant plus accentuées que la survie a été plus longue.

§ 4. — RECHERCHE ET DIAGNOSTIC.

On recherchera le bacille dans le sang, dans la pulpe des différents organes et dans le contenu intestinal.

a. *Examen microscopique.* — Faire des lamelles avec le sang, des frottis avec les pulpes d'organes, le contenu du tube intestinal. On y recherchera le bacille par les procédés décrits plus loin. Les coupes des viscères (foie, rate, poumons) sont particulièrement intéressantes et montrent les capillaires gorgés de bacilles.

b. *Cultures.* — Dans des tubes de bouillon ordinaire, ou mieux de bouillon de poule, on ensemence une gouttelette de sang du cœur ou une öse de pulpe de rate ou de foie.

Au moment de l'autopsie, on peut recueillir et conserver une petite provision de sang qui servira à ensemencer des cultures ultérieures. Pour cela, en suivant les règles ordinaires, on aspire le sang dans une pipette pareille à celle de la figure 72; la pipette pleine, on la ferme par deux traits de chalumeau, à l'extrémité d'abord, puis au point rétréci *a*. Le contenu de l'ampoule ensemencé, même après plusieurs mois, donne une culture virulente.

c. *Inoculations.* — Se pratiquent de préférence chez la poule ou le lapin avec un peu de sang du cœur, de pulpe de rate, ou mieux quelques gouttes de la culture récente en bouillon de poule.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le microbe du choléra des poules est un très petit bacille ou plutôt un coccobacille dont la longueur n'excède pas 0,5 à 1,25 μ et la largeur 0,25 à 0,40 μ. Non coloré, il apparaît comme de petits

points plus ou moins allongés, réfringents à leur partie centrale, souvent associés par deux, animés de mouvements browniens. Mais il doit être étudié de préférence sur les préparations colorées ; on voit alors nettement sa forme ovoïde ; on constate que ses extrémités sont arrondies ; quand la coloration est peu intense, on remarque au centre des microbes un petit espace clair, réfringent. Si la multiplication du bacille a été rapide, et dans les cultures jeunes, les formes arrondies dominent ; dans les cultures plus âgées on trouve surtout des formes allongées.



Fig. 147. — Bacille du choléra des poules. — Culture en bouillon. — Thionine phéniquée (Reich.; Obj. 1/12 im.; Oc. II).

Le Bacille du choléra des poules ne forme pas de spores.

Coloration. — Le Bacille du choléra des poules se colore aisément par les solutions ordinaires. Le bleu phéniqué de Kühne et la thionine phéniquée sont ses colorants d'élection. Il ne prend pas le Gram.

a. *Cultures.* — Colorer avec la thionine phéniquée, le bleu phéniqué de Kühne, ou la solution de Ziehl diluée.

b. *Frottis, lamelles de sang.* — 1° *Coloration simple.* — Faire agir quelques minutes le bleu ou la thionine phéniqués, laver, sécher et monter ; les globules blancs, les noyaux des globules rouges des oiseaux et les bacilles sont colorés en bleu ou en violet intenses.

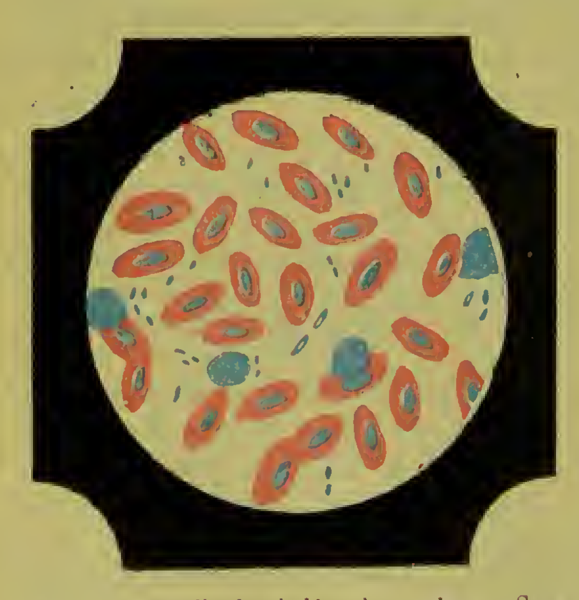


Fig. 148. — Bacille du choléra des poules. — Sang de poule. — Éosine et bleu phéniqué (Reich.; Obj. 1/12 im.; Oc. II).

2° *Double coloration.* — Déposer sur la lamelle de sang un peu de solution aqueuse à 1 p. 100 d'éosine ; après deux à trois minutes de

contact laver, passer au bleu phéniqué, laver, sécher et monter. On obtient ainsi de fort belles préparations : les globules rouges sont teintés par l'éosine, les noyaux et les microbes sont colorés par le bleu (fig. 148); malheureusement l'opération est assez délicate à conduire, il faut surveiller avec soin, sous le microscope, l'action du bleu et l'arrêter dès que la différenciation est obtenue. Le procédé de Chenzinsky donne des résultats moins satisfaisants.

c. *Coupes.* — Employer le procédé de Nicolle au tanin (Voy. p. 226).

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Bacille du choléra des poules est strictement aérobie. Il se développe mal entre +20° et 25°; les cultures sur gélatine restent grêles et se produisent lentement. La température optima de culture est comprise entre 35° et 39°. Les milieux les plus favorables sont le bouillon de poule ou de veau, neutres ou légèrement alcalins

Bouillon. — A 37°, en bouillon de poule, la culture se développe rapidement : dès la dixième ou douzième heure apparaît un léger trouble ; ce trouble augmente dans le cours de la journée, puis le liquide s'éclaircit et il se forme un sédiment peu abondant ; le développement s'arrête du quatrième au huitième jour.

C'est vers la dix-huitième ou la vingt-quatrième heure que la culture présente son maximum de virulence ; à ce moment les formes rondes dominent, plus tard les formes longues l'emportent. Quand la culture est arrêtée, le sédiment est constitué par des granulations dont l'aspect ne rappelle plus celui des microbes mais qui sont encore aptes pendant quelque temps à donner par ensemencement en bouillon neuf une culture virulente.

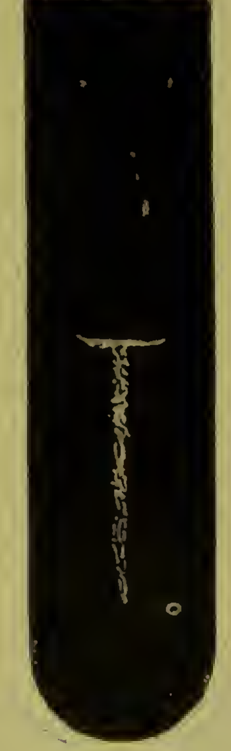


Fig. 149. — Choléra des poules. — Piqûre en gélatine (6e jour).

Gélose. — Le développement se fait rapidement à 37°, on obtient une strie mince, blanche et brillante, plus épaisse au centre que sur les bords.

Sérum coagulé. — Même aspect que sur gélose.

Gélatine. — Développement lent, culture minime, à 22°-23°.

La *piqûre* donne une mince ligne blanche s'étalant un peu en clou à la surface, très peu développée à la profondeur. En *strie*, l'ensemencement produit une très mince raie blanchâtre, parais-

sant bleue par transparence. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Pomme de terre ; eau de levure. — Pas de développement.

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Le Bacille du choléra des poules est très fragile, il périt rapidement dans les cultures. La dessiccation, une température de + 55°, les solutions antiseptiques ou acides très diluées le tuent aisément.

Les cultures en milieux liquides résistent plus longtemps que celles sur milieux solides ; néanmoins une culture en bouillon perd rapidement sa virulence, la vitalité disparaît au bout de six semaines à deux mois. L'atténuation est due à l'action de l'oxygène de l'air ; nous avons vu plus haut que le sang conservait longtemps sa virulence dans des ampoules scellées ; de même on peut conserver des cultures virulentes en scellant dans des ampoules des cultures en bouillon âgées de dix-huit à vingt heures.

§ 2. — ATTÉNUATION. — VACCINATION.

Dans la culture en bouillon conservée à 37°, la virulence a presque complètement disparu au bout de la deuxième semaine : l'inoculation d'une telle culture ne tue plus que deux ou trois animaux sur dix inoculés ; après quelques jours encore la culture est totalement incapable de tuer la poule et ne donne à cet animal qu'une indisposition passagère, son inoculation dans le muscle pectoral ne produit qu'une lésion locale (œdème gélatiniforme, séquestre ou nécrose musculaire). Le virus atténué présente une certaine fixité : en le gardant en ampoules scellées, on maintient son degré d'atténuation ; on peut ainsi conserver des cultures de différentes virulences.

Il est toujours possible de rendre à ces cultures leur entière activité : le virus s'exalte par le passage en série chez le moineau ; un virus incapable de tuer la poule tue encore le moineau ; après quelques passages par ce dernier animal, on obtient de nouveau un bacille pleinement actif, à l'inoculation duquel la poule succombe en quelques heures.

La découverte de l'atténuation des virus, faite par Pasteur en 1878 à propos du Bacille du choléra des poules, entraîna celle des vaccinations microbiennes.

La poule ayant eu une maladie légère après l'inoculation d'un virus atténué et guérie de cette maladie est devenue réfractaire au choléra : elle peut être inoculée sans danger avec les cultures le

plus virulentes. En pratique, on obtient la vaccination en faisant une première inoculation au bout de l'aileron avec un virus très atténué; après quelques jours on injecte un second vaccin plus fort, et l'animal est définitivement préservé.

§ 3. — TOXINE.

Les cultures en bouillon, débarrassées des microbes par filtration sur porcelaine, produisent, quand on les injecte à la poule, une maladie caractérisée par de l'abattement et de la somnolence et évoluant toujours vers la guérison. Cette inoculation confère l'immunité (Pasteur). Les poules vaccinées contre le microbe restent sensibles à la toxine.

Nous terminerons ce chapitre en décrivant en peu de mots quelques microbes, très voisins du Bacille du choléra des poules et causant diverses affections épizootiques qui ont été réunies par Hueppe en un groupe des *septicémies hémorragiques*; Nocard et Leclainche considèrent les germes de ces septicémies comme les variétés d'un même type microbien, la *bactérie ovoïde*. Dans ce groupe, outre le choléra des poules et les affections que nous allons étudier, figure aussi le *hog-choléra* auquel nous consacrerons un chapitre spécial.

LE BACILLE DU CHOLÉRA DES CANARDS.

Le choléra des canards observé par Cornil et Toupet, s'accompagnant de diarrhée souvent sanguinolente, d'affaiblissement, de somnolence, est dû à un petit bacille très voisin de celui du choléra des poules dont il ne se différencie que par les caractères suivants :

1° Il cultive sur pomme de terre en donnant une strie grêle, jaune chamois.

2° Ses cultures, virulentes pour le canard, se montrent à peu près inactives pour la poule et le pigeon et ne tuent le lapin qu'à haute dose.

De ce bacille il faut rapprocher celui de la *maladie des grouses* (Klein), qui présente des caractères analogues, et aussi celui de la *maladie des palombes* de Leclainche, qui, morphologiquement analogue à celui du choléra des canards, est très virulent pour le lapin, moins pour le pigeon et le cobaye, et complètement inactif pour la poule.

LE BACILLE DE LA DYSENTERIE ÉPIZOOTIQUE DES POULES ET DES DINDES.

Décrit par Klein (*Bacillus gallinarum*) et par Lucet. Les symptômes de la maladie sont très semblables à ceux du choléra des poules. Le bacille

lui-même ne diffère guère dans les deux affections qu'il y a peut-être lieu d'identifier. Dans la dysenterie épizootique, les animaux malades ne présentent pas de somnolence; le bacille est indifféremment aérobie ou anaérobie : tels sont les seuls caractères propres à cette maladie.

LE BACILLE DE LA MALADIE DES CYGNES CASCOROBA.

Tretrop a récemment décrit fort complètement une maladie qui a sévi au jardin zoologique d'Anvers sur les cygnes cascoroba. La maladie revêt les symptômes du choléra des canards, les troubles intestinaux dominent; elle épargne les cygnes d'autres espèces, les sarcelles, canards, oies, en contact avec les malades. L'agent de l'affection est un petit coccobacille, indifféremment aérobie, ayant l'aspect du Bacille du choléra des poules, ne prenant pas le Gram. Il est pathogène pour la souris et les passereaux ; le cobaye y est peu sensible; la poule, le canard sont réfractaires.

Tretrop a obtenu difficilement la vaccination de la souris en se servant de cultures atténuées par la chaleur (séjour de dix minutes à $+58^{\circ}$).

LE BACILLE DE LA SEPTICÉMIE SPONTANÉE DU LAPIN.

La septicémie du lapin, que nous avons décrite page 159, est due également à un petit coccobacille analogue à celui du choléra des poules (Th. Smith, Thoinot et Masselin, Eberth et Mandry). La maladie, transmissible par les voies digestives, est inoculable au lapin, au cobaye et à tous les oiseaux.

Morphologiquement, le microbe pathogène prend tantôt la forme d'un coccus, tantôt celle d'un bacille à espace clair analogue à celui du choléra des poules. Il cultive en bouillon, sur gélatine et sur gélose, en présence ou à l'abri de l'air; il ne pousse pas sur pomme de terre. Il s'atténue par le vieillissement des cultures et se conserve à l'abri de l'air comme le Bacille du choléra des poules.

ÉPIZOOTIES DIVERSES A BACILLES OVOÏDES.

A des microbes analogues sont dus : la *septicémie des furets* (Eberth et Schimmelsbuch), le *barbone des buffles* (Oreste et Armanni), la *pleuro-pneumonie septique des veaux* (Poëls), la *maladie du maïs fourrage* (Billings), etc.

CHAPITRE VI

LE BACILLE DU HOG-CHOLÉRA

L'épizootie du porc longtemps confondue avec le rouget et décrite par Salmon sous le nom de *hog-choléra*, par Klein sous celui de *pneumo-entérite infectieuse*, est causée par un microbe voisin du Bacille du choléra des poules et que Nocard et Leclainche rangent dans leur groupe des *bactéridies ovoïdes*.

Le hog-choléra sévit à peu près uniquement sur les porcs ; cependant les poules pourraient contracter la maladie (Rietsch), ainsi que le mouton et la chèvre (Galtier). La viande des animaux morts du hog-choléra serait nocive pour l'homme.

Le hog-choléra atteint de préférence les jeunes porcs et se localise dans les appareils pulmonaire et intestinal. La maladie peut être rapide, la mort survenant dans le premier septénaire; plus ordinairement elle évolue en vingt à trente jours et aboutit à la mort. Au début, on constate de l'inappétence, l'animal reste couché, tousse et s'amaigrit rapidement: dans les cas très aigus, des taches rouges analogues à celles du rouget apparaissent sur la peau; bientôt la fièvre s'allume, survient une diarrhée fétide. Les symptômes intestinaux peuvent prédominer ou s'effacer devant la gravité des symptômes pulmonaires; dans ce dernier cas la mort est certaine.

A l'autopsie on trouve des lésions intestinales que l'on a comparées à celles de la fièvre typhoïde humaine : congestion, tuméfaction, érosion et ulcération des plaques de Peyer et des follicules clos du gros intestin. Quand la maladie a eu une marche subaiguë ou chronique, les parois intestinales atteintes sont tuméfiées, épaissies, la muqueuse est souvent recouverte de fausses membranes grisâtres (entérite diphtéroïde, diphtérie du porc). Les ganglions mésentériques sont congestionnés et hypertrophiés. Les poumons renferment des noyaux de broncho-pneumonie ou de petits infarctus hémorragiques ; si la marche de la maladie a été très aiguë, on constate des ecchymoses sous la peau et dans les séreuses.

On rencontre le bacille en petite quantité dans le sang, mais abondamment dans les lésions intestinales, le suc pulmonaire, le mucus bronchique, l'urine, les ganglions, le foie, la rate, les matières diarrhéiques. Les porcs se contaminent par les voies digestives en mangeant les excréments virulents des animaux malades.

ARTICLE I. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

§ 1er. — ANIMAUX RÉCEPTIFS. — SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

I. — Le cobaye, le lapin, le rat, la souris sont très réceptifs au Bacille du hog-choléra ; ils prennent la maladie, soit par inoculation sous-cutanée, intrapéritonéale, intramusculaire ou intraveineuse, soit par ingestion. Les passages en série chez le lapin augmentent la virulence du bacille.

Symptômes et lésions. — Après inoculation sous-cutanée, le lapin succombe en quatre à huit jours à une septicémie aiguë ou subaiguë; les lésions dominantes sont : la congestion intense du poumon avec noyaux de broncho-pneumonie, et la tuméfaction du foie et de la rate avec production à leur surface de foyers blanchâtres de nécrose. Le sang et surtout la rate sont très riches en bacilles.

II. — Le pigeon est assez résistant au Bacille du hog-choléra : il ne peut être inoculé par les voies digestives et ne succombe aux inoculations péritonéale et surtout sous-cutanée que si la dose de culture injectée est considérable. Les passages en série chez le pigeon exaltent d'une façon extraordinaire la virulence du bacille. En prenant un bacille virulent ayant passé plusieurs fois par le lapin et en l'inoculant en série chez le pigeon, Selander a obtenu un virus tellement actif que 5 centièmes de centimètre cube du sang du dernier pigeon, injectés dans la veine auriculaire d'un lapin neuf, tuent cet animal en quatre ou cinq heures ; dans ce cas, les bacilles arrivent à être trente et quarante fois plus nombreux que les globules du sang.

III. — Le porc est peu sensible à l'inoculation sous-cutanée et résiste même à l'inoculation de hautes doses de cultures virulentes ; mais on vient à bout de sa résistance en s'adressant au virus exalté par le passage chez le pigeon (injection sous-cutanée ou intraveineuse de sang). Il est plus aisé d'infecter le porc par ingestion, en mêlant à ses aliments des viscères d'animaux morts du hog-choléra.

IV. — Le veau, le mouton, la poule sont réfractaires.

§ 2. — PRATIQUE DES INOCULATIONS.

En se basant sur les faits que nous venons d'exposer, on appliquera les méthodes ordinaires. Comme matériel d'inoculation, on emploiera de préférence la pulpe de rate broyée dans l'eau stérile ou le sang des animaux morts du choléra. Les cultures sont moins

actives, mais peuvent cependant être employées avec succès. Pour l'ingestion chez le porc on utilisera des viscères ou de très fortes doses (jusqu'à 1 000 centimètres cubes) d'une culture jeune ensemencée avec un virus exalté par passages en série chez le pigeon.

§ 3. — RECHERCHE ET DIAGNOSTIC.

Suivre la technique exposée à propos du rouget; l'inoculation suivie d'infection chez le cobaye différencie le Bacille du hog-choléra de celui du rouget : nous avons dit que ce dernier microbe est sans action sur le cobaye.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

L'agent du hog-choléra est un petit bacille de forme ovoïde, à extrémités arrondies, mesurant de 0,5 à 1,5 μ de long sur 0,2 à 0,6 μ de large. Dans les pulpes et les humeurs, il n'est pas aisément visible sans coloration et se montre toujours immobile. Il est également immobile dans les cultures en milieux albumineux. Dans les cultures en bouillon, sur gélatine et gélose, au contraire, on peut facilement l'étudier sans coloration, et on constate qu'il est animé de mouvements très vifs. Ces mouvements sont dus à de longs cils vibratiles (30 à 40 μ), au nombre de quatre à sept par bacille et disposés irrégulièrement sur toute la périphérie du protoplasma (Ferrier).

Metchnikoff a attiré l'attention sur le pléomorphisme du Bacille du hog-choléra : on observe dans les cultures, à côté de la forme typique, des filaments assez longs et aussi des coccus véritables, quelquefois groupés en chaînettes.



Fig. 150. — Bacille du hog-choléra. — Culture en bouillon. — Polymorphisme. — Thionine phéniquée (Reich. ; Obj. 1/12 imm. ; Oc. II).

Le Bacille du hog-choléra ne forme pas de spores.

Coloration. — Le microbe se colore bien par les couleurs basiques d'aniline ; le bleu de Kühne, la thionine phéniquée donnent

de bonnes préparations. Avec les solutions peu concentrées, et en particulier avec le bleu, on constate fréquemment la présence d'un espace clair au centre du bacille. Celui-ci ne prend pas le Gram.

On recherche le Bacille du choléra-hog, d'après les indications que nous avons données à propos des maladies spontanée et expérimentale, en appliquant les procédés recommandés pour le Bacille du choléra des poules.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Aérobie facultatif, le Bacille du hog-choléra donne des cultures assez abondantes dans les milieux ordinaires entre + 16° et 40°. La semence sera empruntée à des cultures antérieures, à la rate ou au foie d'animaux morts récemment du hog-choléra.



Fig. 151. — Bacille du hog-choléra. — Frottis de rate de lapin. — Thionine phéniquée (Reich.; Obj. 1/12 imm.: Oc. II).

Bouillon. — A 37° la culture se développe rapidement, même en bouillon légèrement acide ou additionné de sel marin à 7 p. 100. Au bout de vingt-quatre heures on note un trouble uniforme; par la suite il se forme quelquefois un voile très délicat.

Milieux albumineux. — Le bacille pousse dans le sérum, le sang: il est immobile dans ces milieux.

Gélatine. — *Piqûre.* — Développement de petites colonies blanchâtres, irrégulières le long de la piqûre; à la surface, la culture s'étale en un disque blanc crémeux, donnant l'aspect en clou. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Strie. — Le long de la strie, développement d'un enduit blanc paraissant d'abord bleuâtre par transparence, puis devenant crémeux et opaque; au-dessous de la culture, la gélatine prend, pendant les premiers jours, un aspect nuageux caractéristique.

Colonies isolées. — Petites colonies duveteuses, devenant blanc opaque après plusieurs jours, gardant un aspect irrégulier.

Gélose. — L'ensemencement en strie donne rapidement naissance à un mince revêtement blanc et opaque.

Pomme de terre. — Développement d'une strie brun clair, devenant brun foncé au bout de quelques jours et ressemblant jusqu'à un certain point à la culture du Bacille de la morve.

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Le Bacille du hog-choléra conserve pendant plusieurs mois sa vitalité et sa virulence dans les cultures. Dans le sang d'un animal mort du hog-choléra, le bacille exige, pour être tué, un chauffage à 54° prolongé pendant quarante minutes (Selander). La résistance est à peu près la même dans le bouillon.

Cornil et Chantemesse ont démontré que l'action simultanée de l'air et de la chaleur atténue le microbe : ils ont obtenu un bacille atténué par l'exposition d'une culture à + 43° pendant quatre-vingt-dix jours. On peut rendre au bacille atténué sa virulence par des passages en série chez le lapin. On exalte la virulence à un degré excessif par les passages en série chez le pigeon.

§ 2. — VACCINATION. — TOXINE.

Le hog-choléra ne récidive pas : malgré ce fait et la connaissance des virus atténués, la vaccination préventive n'a pas franchi le domaine du laboratoire pour entrer dans la pratique vétérinaire.

Cornil et Chantemesse ont vacciné le lapin par inoculation de leurs cultures atténuées ; Metchnikoff a immunisé le lapin par injection de doses faibles de virus.

Dans l'organisme des animaux inoculés, le Bacille du hog-choléra produit une toxine très énergique (Selander) : le sang d'un lapin tué par le virus exalté est recueilli et chauffé à 57° pendant une heure, les bactéries sont ainsi détruites ; néanmoins l'inoculation de 4 à 8 centimètres cubes de ce sang chauffé tue le lapin en trois ou quatre heures. Cette toxine si active est précipitable par l'alcool et détruite par une température de 60° à 100°. Elle ne se produit qu'en très petite quantité dans les cultures.

En utilisant cette toxine, Salmon chez le pigeon, Selander chez le lapin ont pu obtenir une vaccination très solide ; mais l'immunité ainsi produite ne s'exerce que vis-à-vis du microbe, l'animal vacciné succombe aussi facilement que l'animal neuf à l'injection de la toxine.

§ 3. — SÉROTHÉRAPIE.

Metchnikoff a montré que le sérum des lapins vaccinés est doué de propriétés immunisantes et thérapeutiques : le mélange de ce sérum et de sang virulent ne tue pas le lapin ; l'animal échappe à la mort même quand l'injection de sérum est faite quelque temps après l'inoculation virulente.

LE BACILLE DE LA PNEUMONIE CONTAGIEUSE DU PORC.

L'affection décrite en Amérique sous le nom de *Swine-plague*, en Allemagne sous celui de *Schweineseuche*, relève d'un bacille analogue et peut-être identique à celui du hog-choléra. Dans le sang et surtout dans les lésions pulmonaires et pleurales qui caractérisent la maladie, on trouve un bacille qu'il est impossible de différencier morphologiquement de l'agent du hog-choléra. Aux inoculations, les deux microbes ne réagissent pas de la même façon : le Bacille de la swine-plague est très virulent pour le lapin et la souris, au contraire la poule, le cobaye et le pigeon résistent ordinairement ; il est malaisé d'infecter expérimentalement le porc. Silberschmidt, reprenant l'étude du bacille décrit par Löffler et par Schutz, a montré que chez le lapin on peut obtenir la vaccination réciproque par les produits solubles de la swine-plague et du hog-choléra ; pour lui il y a identité de nature entre les deux affections : la forme de la maladie est fonction de la virulence du microbe.

CHAPITRE VII

LES STAPHYLOCOQUES PYOGÈNES

A côté du *Staphylocoque doré*, découvert par Pasteur, sont venus se placer depuis deux autres staphylocoques pyogènes : le *Staphylococcus pyogenes albus* et le *Staphylococcus pyogenes citreus*. Ces trois microbes ne diffèrent que par la coloration de leurs cultures ; leurs propriétés biologiques sont les mêmes. Avec Rodet et Courmont, nous pensons qu'il ne faut voir en eux que trois races d'une même espèce et nous réunirons leur description dans un même chapitre. Nous prendrons le Staphylocoque doré comme type et nous nous contenterons de noter, en temps utile, les particularités propres à ses deux congénères.

Les staphylocoques pyogènes sont très répandus dans la nature ; on les rencontre dans l'air, dans certaines eaux, à la surface de la peau, des muqueuses, dans le tube digestif, sous les ongles, etc.

En pathologie humaine, on les trouve fréquemment dans le pus, particulièrement dans le furoncle et l'ostéomyélite (Pasteur), divers abcès, les pustules d'ecthyma, etc. Parfois le staphylocoque passe dans le sang, détermine l'infection purulente, la pyémie.

On a rencontré les staphylocoques pyogènes dans des pleurésies, péricardites ou péritonites suppurées et aussi dans l'endocardite ulcéreuse. Ils causent encore certaines broncho-pneumonies, des angines, etc. Ils se trouvent fréquemment associés au Bacille tuberculeux dans les pleurésies et les méningites suppurées ; ils compliquent la pelade, les tricophyties, etc. ; on note souvent leur association au Pneumocoque dans la pneumonie, au Bacille de Löffler dans la diphtérie ; ils favorisent le développement des spores du Vibrion septique (Besson), du Bacille de la pourriture d'hôpital (Vincent), du Bacille de l'influenza (Grassberger), etc.

On les rencontre dans un grand nombre de suppurations chez les mammifères et les oiseaux ; le Staphylocoque doré est l'agent d'une ostéomyélite des jeunes oies (Lucet) ; il pourrait même se développer chez les poissons et aurait causé une épidémie qui a sévi sur les goujons du Rhône (Charrin).

ARTICLE I. — STAPHYLOCOCCIE EXPÉRIMENTALE.

§ 1er. — ESPÈCES RÉCEPTIVES. — SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

Homme. — Garré a pu déterminer la production de furoncles par des frictions énergiques de la peau avec un tampon imbibé d'une culture de Staphylocoque doré.

Lapin. — Le lapin est l'animal de choix pour les inoculations.

Inoculation sous-cutanée. — L'inoculation sous-cutanée de quelques gouttes d'une culture virulente produit un abcès, la température s'élève, puis l'abcès s'ouvre à l'extérieur, se vide et tout rentre dans l'ordre. D'ordinaire, l'animal ne succombe pas; rarement, la mort se produit par septicémie.

Inoculation intrapéritonéale. — Elle est beaucoup plus sévère et entraîne rapidement une péritonite suppurée mortelle. Le passage par le lapin exalte la virulence des staphylocoques; chez les animaux qui succombent on trouve le microbe dans le sang et les viscères.

Inoculations intrapleurale, intra-articulaire. — Il se développe un épanchement purulent et l'animal succombe en peu de jours ; si le staphylocoque est très virulent, il se produit une septicémie rapide qui entraîne la mort en vingt-quatre ou quarante-huit heures.

Inoculation intraveineuse. — Elle produit d'ordinaire des accidents graves. Dans les cas les plus sévères, le microbe envahit rapidement l'organisme et détermine une pyémie avec localisations suppuratives dans les viscères, et surtout dans les reins; la mort arrive en vingt-quatre ou quarante-huit heures. Chez certains individus, et particulièrement si l'on a produit au préalable des lésions du cœur, l'inoculation détermine des endocardites ulcéreuses ou végétantes mortelles (Wyssokowitch, Ribbert, Bonome).

Rodet et Lannelongue ont obtenu, par l'inoculation intraveineuse, des lésions d'ostéomyélite; l'ostéomyélite se produit très facilement quand on traumatise un os avant l'inoculation; on peut observer chez le lapin des ostéites juxta-épiphysaires analogues à celles de l'homme. Bezançon et Griffon ont étudié un staphylocoque dont l'inoculation provoque à coup sûr des lésions articulaires.

Cobaye, rat, souris, chien. — Ces animaux sont moins régulièrement sensibles que le lapin; chez eux, l'inoculation sous-cutanée produit un abcès; l'inoculation intrapéritonéale est susceptible de déterminer une septicémie mortelle.

Oie. — Lucet, en inoculant des oies avec le staphylocoque retiré de l'ostéomyélite des jeunes oies, a pu reproduire les lésions carac-

téristiques de la maladie. L'ingestion et l'inoculation sous-cutanée restent inactives, mais l'injection dans la veine de l'aile de cultures en bouillon ou de pus osseux produit la mort en trois à quatre jours. A l'autopsie, on trouve des ostéomyélites multiples ; le foie est volumineux ; le staphylocoque existe dans la moelle osseuse, le pus osseux, la pulpe splénique.

§ 2. — RECHERCHE ET DIAGNOSTIC.

On recherche les staphylocoques dans le pus, les humeurs, le sang.

a. **Examen microscopique.** — Les lamelles et frottis préparés avec le pus, les humeurs, etc., seront colorés :

1° Les uns, avec une des solutions colorantes phéniquées (bleu de Kühne, thionine phéniquée, fuchsine de Ziehl diluée) ;

2° Les autres, par la méthode de Gram : les staphylocoques prennent le Gram ; par le procédé de la double coloration, on obtient, avec l'éosine comme colorant de fond, de très belles préparations.

b. **Cultures.** — Dans le pus et les divers exsudats, le staphylocoque peut être associé à divers microbes, ou bien les diverses races de staphylocoques peuvent se trouver mélangées : dans l'examen d'un pus, on devra toujours pratiquer des isolements. En règle, on fera plusieurs ensemencements :

1° Ensemencer une goutte du produit dans un tube de bouillon (culture totale).

2° Pour pratiquer des isolements, on charge une öse du produit à étudier, et avec cette öse on ensemence en surface trois tubes de gélose, sans recharger l'öse, suivant la méthode indiquée page 89 ; on obtient ainsi des colonies isolées, qu'il sera facile de différencier.

On pourrait encore ensemencer des plaques de gélatine, mais ce procédé expose à laisser passer inaperçus certains microbes, tels que le Pneumocoque et le Streptocoque.

c. **Inoculations.** — Pour déterminer la virulence des cultures obtenues, on les inocule sous la peau et dans le péritoine du lapin.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Coccus sphériques de 0,5 à 0,9 μ de diamètre, immobiles, rarement isolés ou associés en diplocoques ou en courtes chaînettes de deux ou trois éléments, ordinairement groupés en amas irréguliers de cinq ou trente coccus, amas que l'on a comparés à des grappes.

Coloration. — Les staphylocoques se colorent très facilement par les couleurs basiques d'aniline et prennent le Gram.

Ces caractères sont communs à toutes les races ou variétés de staphylocoques pyogènes.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Les staphylocoques cultivent entre + 15° et 44°, sur tous les milieux de culture, à l'abri ou en présence



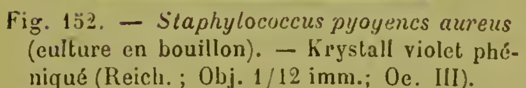


Fig. 152. — *Staphylococcus pyogenes aureus* (culture en bouillon). — Krystall violet phéniqué (Reich. ; Obj. 1/12 imm.; Oc. III).



Fig. 153. — *Staphylococcus pyogenes aureus*, piqûre profonde en gélatine.

de l'air. La température optima est au voisinage de 35°-37°; la température la plus favorable à la production des pigments est comprise entre 20° et 25°; la matière colorante ne se produit pas dans le vide.

STAPHYLOCOCCUS PYOGENES AUREUS.

Bouillon. — A 37°, trouble en douze à vingt-quatre heures, puis précipité blanc abondant, le bouillon restant trouble ; par la suite, le précipité prend une teinte jaunâtre qui peut aller jusqu'à l'orângé vif ; la coloration se manifeste parfois tardivement et reste peu marquée. Dans les vieilles cultures, le Staphylocoque doré perd souvent la propriété de fabriquer du pigment et devient identique au Staphylocoque blanc.

Gélatine. — *Piqûre.* — A 20°, en vingt-quatre à trente-six heures, apparition d'une culture granuleuse le long de la piqûre; vers le cinquième jour, il se forme un entonnoir de liquéfaction, plein de liquide trouble et au fond duquel se dépose un précipité blanc jaunâtre; l'entonnoir de liquéfaction s'élargit ensuite, atteint les bords du tube et prend peu à peu la forme d'un cylindre; il est rare que la liquéfaction atteigne le fond du tube. Il existe des variétés de Staphylocoque doré pour lesquelles la liquéfaction est beaucoup plus tardive; nous avons possédé une de ces variétés, présentant d'ailleurs tous les caractères du Staphylocoque doré et qui ne commençait à liquéfier que vers le quinzième jour à 20°; la liquéfaction restait minime.

Colonies isolées. — Au bout de deux à quatre jours à 20°, petites colonies régulièrement arrondies, grisâtres, avec le centre jaune; bientôt, autour de ces colonies, se produit une liquéfaction annulaire; la zone liquéfiée s'étend plus ou moins rapidement; dans le liquide trouble nagent des flocons jaunes.



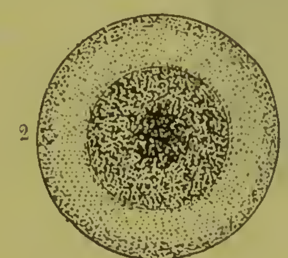


Fig. 154. — *Staphylococcus pyogenes aureus.* — Cultures sur plaques de gélatine. — 1, colonie de quarante-huit heures; 2, colonie de cinq jours.



Fig. 155. — Staphylocoque doré. — Culture sur gélose au huitième jour.

Gélose. — Sérum solidifié. — A 37°, le long de la strie d'inoculation apparaissent en vingt-quatre heures de nombreuses colonies blanches arrondies qui confluent rapidement pour former une large bande plus ou moins lisse et humide; bientôt la strie prend une coloration allant du jaune sale au jaune orangé vif; parfois la coloration ne se montre que vers le huitième ou dixième jour.

Pomme de terre. — C'est sur ce milieu que le Staphylocoque doré donne la coloration la plus intense. Vers le deuxième ou quatrième jour à 37°, il se produit une couche épaisse d'un jaune plus ou moins vif.

Lait. — Le Staphylocoque pousse en coagulant rapidement le lait.

STAPHYLOCOCCUS PYOGENES ALBUS.

Mêmes caractères que le précédent, mais les cultures restent toujours blanches; sur *gélose*, la teinte est d'un blanc mat, porcelanique; la liquéfaction de la *gélatine* est souvent plus lente qu'avec le *Staphylococcus aureus*.



Fig. 156. — *Staphylococcus albus*. — Strie sur gélose au huitième jour.



Fig. 157. — *Staphylococcus citreus*. — Strie sur gélose au huitième jour.

STAPHYLOCOCCUS PYOGENES CITREUS.

Mêmes caractères que le *Staphylococcus aureus*, sauf la teinte des cultures qui est jaune-citron.

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ. — VIRULENCE.

Vitalité. — Les staphylocoques ne forment pas de spores; néanmoins, ils conservent fort longtemps leur vitalité dans les cultures : dans le bouillon, on les retrouve vivants après douze et seize mois.

Dans les cultures, les staphylocoques résistent mal à l'action de la chaleur; ils sont tués par une exposition de vingt-quatre heures à 55° ou de quinze minutes à 80°. Desséchés dans le pus, les substances albuminoïdes, ils résistent plusieurs minutes dans la vapeur d'eau à 100°.

Très sensibles aux antiseptiques quand ils sont pris dans les cultures, les staphylocoques sont beaucoup plus résistants quand ils se trouvent mélangés à des matières albuminoïdes desséchées.

Virulence. — La virulence des staphylocoques est soumise à des variations que rien ne peut permettre de prévoir. En règle, cette virulence baisse notablement dans les cultures anciennes ; pour la conserver, il importe de faire fréquemment des réensemencements et, de temps en temps, des passages par le lapin; les inoculations en série dans le péritoine des lapins exaltent la virulence.

Le staphylocoque recueilli dans les milieux extérieurs se montre

souvent inactif; parfois même le staphylocoque que l'on vient d'isoler d'un foyer purulent chez l'homme est absolument dépourvu de virulence vis-à-vis des animaux de laboratoire.

La présence de glucose dans les milieux de culture exalte la virulence des staphylocoques (Budjwid, Nicolas).

§ 2. — TOXINES.

Le Staphylocoque, dans les cultures, produit des acides gras aux dépens des matières sucrées ; il transforme le lactose en acide lactique, et, dans certaines conditions, produit des acides acétique, valérianique, butyrique et propionique ; aussi les cultures présentent-elles rapidement une odeur aigre.

D'autre part, le Staphylocoque produit de petites quantités d'indol et des diastases liquéfiant la gélatine et peptonisant le blanc d'œuf.

Enfin les cultures contiennent des toxines.

I. — Christmas filtre sur la bougie Chamberland une culture de Staphylocoque doré en bouillon, puis il précipite le filtrat par 4 ou 5 volumes d'alcool fort. Le précipité est jeté sur un filtre de papier, lavé à l'alcool, puis repris par l'eau. La solution obtenue a des propriétés phlogogènes peu marquées : injectée dans la chambre antérieure de l'œil du lapin, elle produit une suppuration minime.

II. — Leber extrait des cultures une substance soluble dans l'alcool, cristallisable, qui a des propriétés phlogogènes marquées et produit de la suppuration et même des nécroses dans les tissus où elle est injectée ; Leber désigne cette substance sous le nom de *phlogosine*.

III. — Rodet et Courmont ont étudié plus complètement les produits toxiques du Staphylocoque pyogène.

a. Des cultures en bouillon âgées de vingt jours environ (35°) sont soumises pendant vingt-quatre heures à une température de 55°, pour tuer les microbes, puis filtrées sur papier. Le filtrat est faiblement toxique pour le chien et le lapin.

Chez le chien, des symptômes d'empoisonnement se manifestent quand on en injecte une dose de 1cc,3 par kilogramme d'animal, mais la mort ne survient rapidement (au minimum en dix-sept heures) que si l'on injecte dans la jugulaire la dose formidable de 35 centimètres cubes par kilogramme; il se produit alors un abaissement de température, une tendance à l'arrêt de la respiration et du cœur, des vomissements, des convulsions et des tremblements.

Le lapin est encore moins sensible : un lapin de 1 900 grammes ayant reçu 10 centimètres cubes de culture chauffée n'est mort qu'au bout de six jours, après avoir présenté de l'amaigrissement et une diminution de poids.

La toxine est très altérable et perd rapidement ses propriétés par le vieillissement.

b. Une culture de vingt jours filtrée sur la bougie Chamberland s'est montrée moins toxique encore ; après injection intraveineuse de doses atteignant 10 et 15 centimètres cubes, des lapins de 2 kilogrammes n'ont présenté qu'une élévation passagère de la température centrale sans perte de poids.

c. Des cultures âgées de vingt jours ont été décantées ; le liquide clair a été filtré sur plusieurs feuilles de papier, puis le filtrat a été mélangé à trois ou quatre fois son poids d'alcool fort ; le précipité recueilli sur un filtre, lavé à l'alcool et desséché, a été repris par l'eau.

1° La solution aqueuse obtenue s'est montrée peu toxique.

Pour tuer en deux heures un chien de 6 kilogrammes, il a fallu en injecter dans les veines une quantité correspondant à 200 centimètres cubes de culture ; les symptômes observés ont été : dyspnée, rythme de Cheyne-Stokes, abaissement de la température centrale, tremblements, convulsions, contractures.

Le lapin résiste mieux que le chien ; il ne succombe pas à des doses correspondant à 40 et 50 centimètres cubes de culture ; avec le précipité fourni par 140 centimètres cubes de culture, la mort n'est survenue qu'au bout de huit jours.

2° D'un autre côté, la solution alcoolique séparée par le filtre du précipité albuminoïde et évaporée dans le vide a fourni un résidu qui a été repris par l'eau.

Deux chiens de 9 kilogrammes n'ont pas succombé à l'injection intraveineuse de doses de cette solution correspondant à 260 et 500 centimètres cubes de culture : un chien de 10 kilogrammes a succombé à une injection représentant 210 centimètres cubes de culture, après avoir présenté de l'anesthésie généralisée, l'abolition des réflexes, une résolution complète, enfin un arrêt du cœur et de la respiration.

Le lapin est peu sensible ; il n'a jamais succombé rapidement à l'inoculation des matières solubles dans l'alcool ; un sujet a survécu vingt jours à l'injection d'une dose représentant 85 centimètres cubes de culture.

Les auteurs concluent que les substances solubles dans l'alcool, d'une part, et les substances insolubles dans ce liquide, d'autre part, injectées séparément, sont plus toxiques que le mélange total. Ces deux groupes de substances auraient des effets antagonistes et se neutraliseraient partiellement dans les mélanges. La faible toxicité des produits obtenus par Courmont et Rodet rend ces appréciations fort délicates et leurs résultats méritent confirmation.

IV. — Mosny et Marcano ont obtenu des cultures en bouillon qui, après filtration, tuaient les lapins en quelques secondes par injection intraveineuse à la dose de 10 centimètres cubes. A la dose de 1 à 2 centimètres cubes, le filtrat rend l'animal cachectique et la mort survient en cinq à six semaines : les animaux qui survivent à l'ino-

culation de la toxine ne présentent jamais d'immunité contre le Staphylocoque pyogène.

§ 3. — VACCINATION ET SÉROTHÉRAPIE.

Ces points de l'histoire des staphylocoques sont peu connus encore; les travaux sont peu nombreux et ont fourni trop souvent des résultats contradictoires.

Mosny et Marcano ont échoué à vacciner le lapin en lui injectant de petites doses de toxine active.

D'après Courmont, la seule toxine soluble dans l'alcool jouirait de propriétés vaccinantes, les produits précipités par l'alcool prédisposant au contraire à l'infection; en injectant la toxine soluble obtenue par la méthode que nous avons exposée plus haut, Courmont a pu obtenir une vaccination relative : le sérum des animaux ainsi traités paraît atténuer la virulence du Staphylocoque ; de nouvelles recherches sont nécessaires pour obtenir une démonstration complète.

Les travaux de Viquerat et Kosc et de Parascandolo ont abouti à l'obtention d'un sérum préventif et curatif; ce sérum, obtenu en injectant des cultures virulentes en bouillon sucré, stérilisées par addition de 5 p. 100 d'acide phénique, serait antitoxique et microbicide.

Capman injecte à des lapins et à des chiens une culture filtrée de Staphylocoque préparée en bouillon peptonisé à 1 p. 100 et âgée de vingt jours (37°); après plusieurs injections de toxine, il laisse l'animal se reposer pendant quinze à vingt jours, puis il prélève du sang. Ce sang a des propriétés bactéricides et antitoxiques; injecté à des lapins et à des cobayes. il les préserve et les guérit même de l'infection staphylococcique.

LE MICROCOCCUS TETRAGENES.

Le *Micrococcus tetragenes* a été signalé pour la première fois par Koch, dans le pus d'une caverne pulmonaire, et étudié par Gaffky.

Le Tétragène, très répandu dans l'air, est l'un des microbes qui s'associent le plus souvent au Bacille de Koch dans la tuberculose pulmonaire. Il se rencontre fréquemment dans la salive et le mucus nasal des sujets sains ; il est susceptible de devenir pathogène et cause des *angines* (angines sableuses de Dieulafoy et Appert ; Lartigau) et *diverses suppurations* (septicopyohémies, pleurésies purulentes, méningites suppurées, adénites cervicales, abcès dentaires, furoncles).

Maladie expérimentale. — La souris blanche est très réceptive; l'inoculation sous-cutanée de quelques gouttes de culture en bouillon entraîne la mort par septicémie en vingt-quatre à quarante-huit heures; le sang et les viscères contiennent de nombreuses tétrades.

Le cobaye succombe en trois à cinq jours après l'inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale.

Chez le lapin, moins réceptif, l'inoculation sous-cutanée produit un abcès à évolution froide (Tissier) ; l'inoculation intrapéritonéale, une péritonite à pus épais.

Aspect microscopique. — Dans les crachats, le pus, le sang, le Tétragène apparaît sous forme de coccus isolés, de diplocoques ou de tétrades ; les éléments sont volumineux et leur diamètre dépasse souvent 1 μ ; ils prennent parfois des formes ovoïdes, en haricot. Ils sont fréquemment entourés d'une capsule irrégulière.

Dans les cultures en milieux ordinaires on observe rarement les formes en tétrade, les éléments sont isolés ou groupés par deux, et leur diamètre n'excède guère 0,6 à 0,7 μ, les capsules manquent ; mais dans les cultures en sérum de lapin non coagulé les formes en tétrade reparaissent en même temps que les capsules.

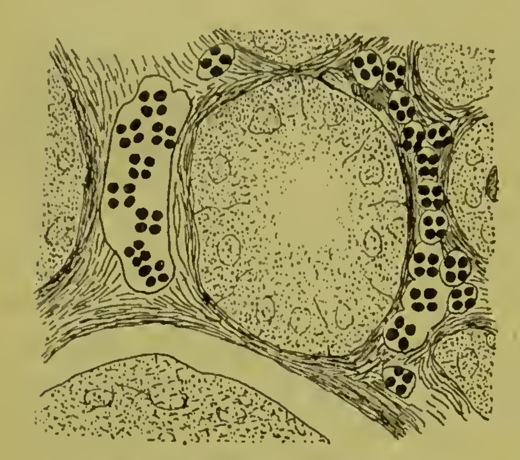


Fig. 158. — *Micrococcus tetragenes* Rein de souris (1200/1).

Coloration. — Le Tétragène se colore aisément par les procédés ordinaires ; il prend le Gram.

Les capsules se colorent par les méthodes ordinaires ; elles sont souvent peu nettes et irrégulières.

Cultures. — Le Tétragène cultive à partir de + 15° dans les milieux ordinaires. A 20°, la culture est lente ; la température optima est aux environs de + 37°. Il est aérobie.

Bouillon. — Léger trouble, puis dépôt épais, crémeux.

Gélatine. — La gélatine n'est pas liquéfiée ; les *colonies isolées* forment de petits points blancs, de 1 à 2 millimètres de diamètre, à surface bombée. L'ensemencement en *piqûre* donne, à la profondeur, de petites colonies blanches isolées à la surface un bouton blanc bombé. Chauffard et Ramond ont décrit un Tétragène liquéfiant la gélatine ; il existe des variétés chromogènes (*M. t. aureus ; M. t. subflavus*).

Gélose. — Colonies blanches confluant en un enduit blanchâtre, crémeux, très visqueux.

Pomme de terre. — Colonies arrondies confluant en un enduit blanc visqueux.

Sérum de lapin liquide. — Trouble, puis dépôt blanchâtre constitué par des microbes encapsulés.

Lait. — Pas de coagulation, culture peu abondante.

Recherche et diagnostic. — L'examen microscopique des exsudats montre le Tétragène avec sa forme caractéristique. L'isolement est aisé sur plaques de gélatine. L'inoculation à la souris permet d'identifier le Tétragène (septicémie avec nombreux microbes encapsulés dans le sang, les viscères, etc.).

Propriétés biologiques. — La *vitalité* du Tétragène persiste plusieurs mois dans les cultures ; le microbe est tué par une exposition de quelques minutes à 60°. La *virulence* est très variable pour les différents échantillons du microbe, mais les races actives conservent presque indéfiniment leur virulence dans les cultures.

Les *cultures filtrées* ou chauffées à 60° sont très faiblement toxiques et ne sont pas pyogènes.

CHAPITRE VIII

LE STREPTOCOQUE PYOGÈNE

Le Streptocoque a été découvert par Pasteur et Doleris, dans le sang de femmes atteintes de fièvre puerpérale.

Il cause un grand nombre de suppurations (Ogston, Passet, Rosenbach), la fièvre puerpérale (Pasteur et Doleris, Widal, Arloing), des phlébites; il est l'agent d'un grand nombre d'angines érythémateuses, pseudomembraneuses et phlegmoneuses (Prudden, Raskin, Veillon, Lemoine, etc.), de certaines broncho-pneumonies, pleurésies purulentes, péritonites, méningites, endocardites, otites, dermites, etc., ; il cause fréquemment des ostéomyélites, l'infection purulente chirurgicale; enfin le *Streptocoque de l'érysipèle* de Fehleisen est identique au *Streptocoque pyogène*.

Associations. — Le Streptocoque est encore plus redoutable quand il s'associe à certaines bactéries pathogènes et entre en scène, au titre d'infection secondaire, au cours d'une maladie préexistante : il exalte la virulence des microbes auxquels il se surajoute; c'est ainsi qu'on peut le rencontrer à côté du bacille spécifique dans la grippe (Vaillard et Vincent, Ribbert, Weichselbaum, Chantemesse et Vidal, etc.), dans la fièvre typhoïde (Vincent), dans la diphtérie (Löffler, Behring, Roux et Martin). Il s'associe encore au Pneumocoque, au Bacille tuberculeux, au Bacille de la pourriture d'hôpital; il cause un grand nombre des complications de la scarlatine (Combemale et Lamy, Babès, Raskin, Kurth, etc.).

Le Streptocoque se rencontre, chez l'homme sain, à la surface de la peau, dans les cavités naturelles ouvertes au dehors (bouche, nez, vagin), dans la salive, etc.

Kurth et Eiselsberg l'ont trouvé dans l'air, Nicolaïer et Garnieri dans le sol, Landmann, dans de l'eau de puits. Dans les milieux extérieurs le Streptocoque semble perdre très rapidement sa virulence.

Article I. — STREPTOCOCCIE EXPÉRIMENTALE.

§ 1er. — ANIMAUX RÉCEPTIFS. — SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

Lapin. — Le lapin est l'animal de choix pour l'étude de la streptococcie expérimentale. Les cultures employées pour les inoculations doivent être âgées de deux à trois jours.

A. *Inoculation sous-cutanée.* — On la pratique d'ordinaire à l'oreille, où l'on peut mieux observer la marche des lésions. Suivant le degré de virulence de la culture, l'injection de 10 à 20 gouttes provoque :

a. Un petit abcès;

b. Une rougeur érysipélateuse fugace;

c. Un érysipèle étendu à la totalité de l'oreille et pouvant devenir phlegmoneux, sans entraîner de généralisation ;

d. Un érysipèle phlegmoneux suivi d'arthrites suppurées et entraînant la mort en quinze à trente jours. Dans ce cas, à l'autopsie on ne trouve d'ordinaire le Streptocoque ni dans le pus articulaire, ni dans le sang;

e. Une septicémie rapide entraînant la mort en quelques jours ; à l'autopsie on trouve le Streptocoque dans le sang.

B. *Inoculation intraveineuse.* — L'inoculation intraveineuse avec un virus actif entraîne la mort en vingt-quatre ou quarante-huit heures par septicémie ; le Streptocoque se trouve en abondance dans le sang.

Avec un virus peu actif on obtient des localisations suppurées sur les séreuses ; la guérison peut survenir ; la mort arrive souvent au bout de dix à vingt jours ; le Streptocoque n'existe pas dans le sang.

C. *Inoculation intrapéritonéale.* — L'inoculation intrapéritonéale est aussi sévère que l'inoculation intraveineuse ; le Streptocoque virulent tue le lapin en vingt-quatre ou soixante-douze heures.

Les passages en série par le lapin exaltent indéfiniment la virulence du Streptocoque (Marmorek, Gromakowsky) ; par cette méthode, Marmorek a pu obtenir un Streptocoque dont l'injection intrapéritonéale tue le lapin à la dose de un millionième et même un milliardième de centimètre cube.

Souris. — La souris présente à peu près la même sensibilité que le lapin. Après inoculation sous-cutanée, elle succombe en vingt-quatre à soixante-douze heures si le Streptocoque est virulent, et plus lentement, après avoir présenté des complications suppuratives, si le microbe est peu actif.

Cobaye. — Le cobaye est peu réceptif : après inoculation sous-cutanée d'un Streptocoque actif, il fait d'ordinaire un abcès et guérit.

Le Streptocoque exalté de Marmorek, injecté dans le péritoine du cobaye à la dose minima de 2/10 de centimètre cube, tue cet animal en quinze à vingt heures environ par péritonite purulente avec pénétration des microbes dans le sang.

Grands animaux. — L'âne est assez sensible ; le cheval un peu moins, le mouton et le chien enfin le sont à un très faible degré.

§ 2. — RECHERCHE DU STREPTOCOQUE.

a. **Examen microscopique.** — Les lamelles préparées avec le pus, le sang, les sérosités, seront colorées, d'une part avec le krystall violet ou la thionine phéniqués, d'autre part par la méthode de Gram.

Les coupes d'organes, de peau érysipélateuse, etc., fixés au sublimé acide ou à l'alcool absolu, seront colorées de préférence par la méthode de Gram (double ou triple coloration).

b. **Cultures.** — Le sang sera ensemencé en bouillon et sur gélose.

Pour le pus, il est nécessaire de faire un isolement en surface sur trois tubes de gélose (p. 89) pour obtenir des colonies séparées, dans le cas où il existerait des associations.

Pour obtenir une culture pure en partant d'un érysipèle, après asepsie de la peau (Voy. p. 191), on pratique une piqûre à la lancette ; les premières gouttes de sang qui sourdent sont essuyées avec du papier filtre stérilisé, puis on comprime entre le pouce et l'index la peau autour de la piqûre, on aspire avec une pipette la goutte de sérosité qui suinte et on l'ensemence en bouillon.

c. **Inoculations.** — Pour déterminer la virulence du Streptocoque, on peut inoculer directement au lapin l'humeur contenant le microbe ; il est préférable de faire une culture en bouillon ou en bouillon-sang et de l'inoculer quand elle est âgée de deux jours.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Streptocoque se présente sous la forme de coccus immobiles associés en chaînettes.

Les coccus mesurent 0,6 à 1 μ de diamètre, dans le sang et dans le pus ; dans les cultures leurs dimensions sont assez variables ; ils présentent souvent une forme légèrement ovalaire.

Les chaînettes du Streptocoque type (*Streptococcus erysipelatis* de Fehleisen, *Streptococcus pyogenes* de Rosenbach), sont constituées dans le pus, le sang, les cultures sur milieux solides, par l'association de six

à quinze grains, et dans les cultures en milieux liquides par un nombre beaucoup plus considérable de grains (quinze à quarante et plus).

Mais il n'y a rien de variable comme le nombre de grains des chaînettes et même la forme des grains ; aussi a-t-on décrit plusieurs races de streptocoques : le *Streptococcus tenuis* de Veillon, rencontré dans certaines angines, est constitué par des coccus très petits, ovoïdes, associés en courtes chaînes de deux à six éléments ; le *Streptococcus brévis* de Lingelsheim, rencontré dans la salive, des fausses membranes d'angines, certains pus, est constitué par des éléments analogues à ceux du Streptocoque de Fehleisen, mais toujours réunis en diplocoques ou en chaînettes de quatre à six articles, constituées par des réunions de diplocoques. Kurth a décrit comme agent pathogène de la scarlatine un streptocoque, *Streptococcus conglomeratus*, caractérisé par la tendance des longues chaînettes à s'agglomérer sous forme d'amas analogues à ceux des staphylocoques (fig. 162 à 165).



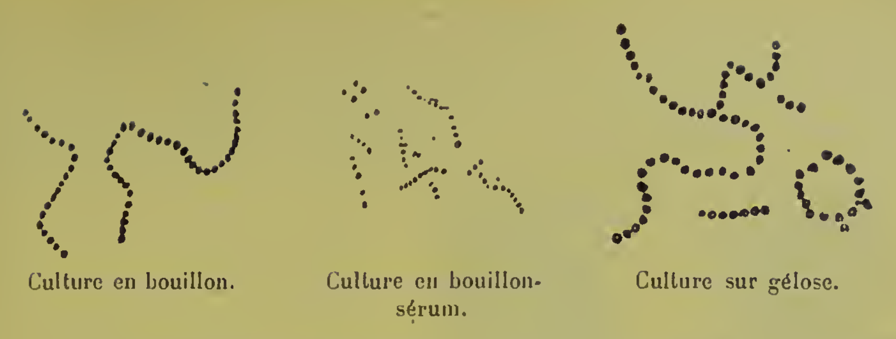
Fig. 159. — *Streptococcus pyogenes* (pus d'empyème). — Méthode de Gram (Reich. ; Obj. 1/12 imm.; Oc. III).



Fig. 160. — *Streptococcus pyogenes* (culture en bouillon). — Krystall violet phéniqué (Reich. ; Obj. 1/12 imm.; Oc. III).

Beaucoup d'auteurs identifient ces divers streptocoques et ne les considèrent que comme des formes accidentelles d'une seule et même espèce. Marmorek, qui soutient cette opinion, a montré que l'on pouvait faire varier le nombre, la forme et la disposition des éléments des streptocoques en produisant des modifications dans la composition des milieux de culture (fig. 161).

Coloration. — Le Streptocoque pyogène se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram.



Culture en bouillon. Culture en bouillon-sérum. Culture sur gélose.

Fig. 161. — Formes d'un même streptocoque cultivé sur milieux différents, d'après Zenoni.

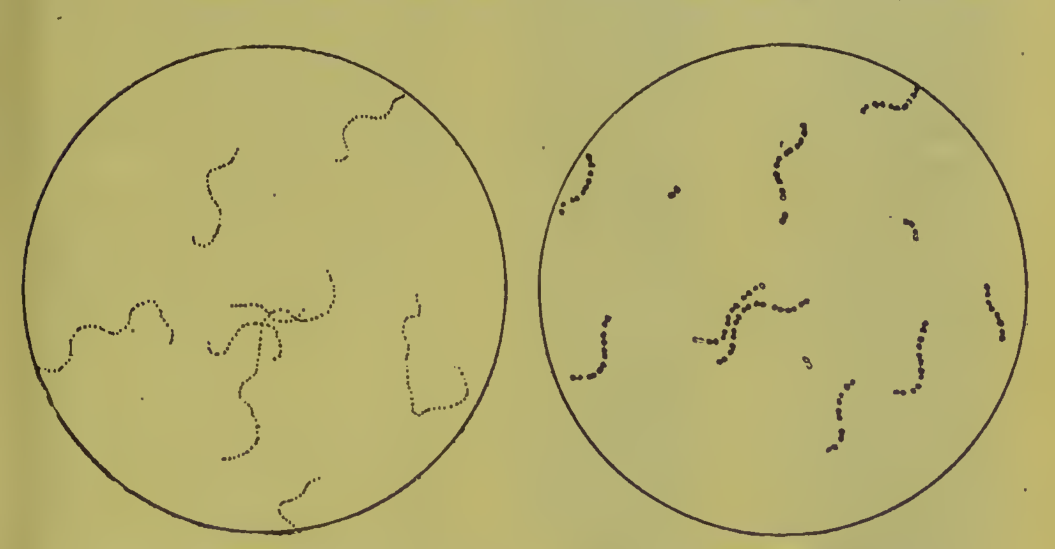


Fig. 162. — Formes à éléments très petits. Fig. 163. — Formes en diplocoques.

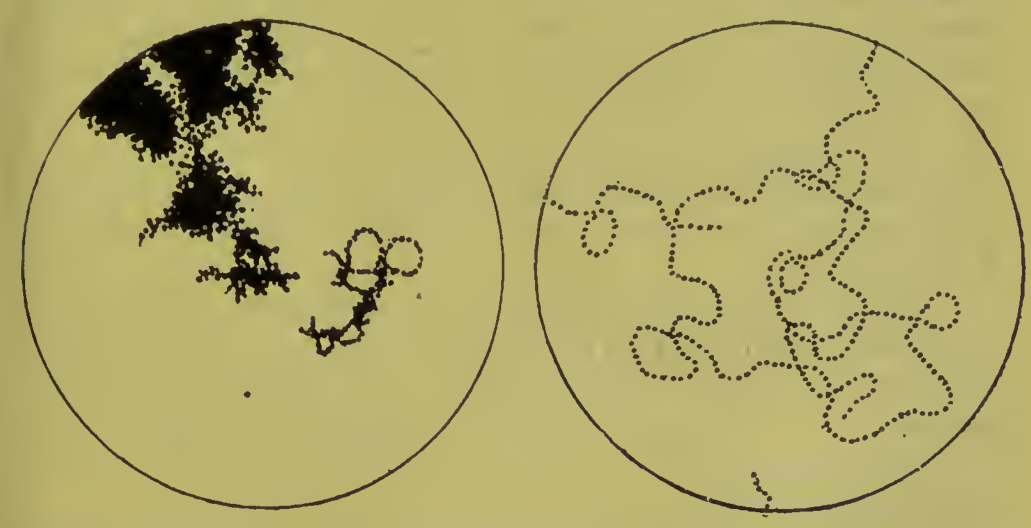


Fig. 164. — Formes agglomérées (*Streptococcus conglomeratus*). Fig. 165. — Formes très longues.

Fig. 162 à 165. — Diverses formes du Streptocoque pyogène.

Il faut cependant admettre quelques exceptions à la deuxième partie de cette règle : le streptocoque décrit par Lingelsheim ne se colore pas par la méthode de Gram ; il en est de même d'un streptocoque rencontré par Étienne dans une angine ; Lemoine a retiré d'un érysipèle un streptocoque qui, tantôt prenait le Gram, tantôt se décolorait quand on le soumettait à cette réaction. Il serait intéressant de faire subir à ces races le contrôle de la coloration par la méthode de Claudius.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Streptocoque est facultativement aérobie. Il commence à se développer à + 18°, mais la culture est insignifiante entre 18° et 20° ; le développement s'arrête vers 46° ; la température optima est de 37°-38°. Le Streptocoque préfère les milieux additionnés de sérum ou de sang et exige la neutralisation exacte ou une légère alcalinisation des milieux de culture.

Bouillon. — Le Streptocoque type ne trouble pas le bouillon ; à 37°, au bout de vingt-quatre heures, il produit sur la paroi du tube un léger dépôt floconneux adhérent ; vers le troisième ou quatrième jour ces petits flocons deviennent plus volumineux, puis ils tombent au fond du vase et y forment un dépôt grisâtre assez abondant ; le bouillon prend une réaction assez fortement acide (acide lactique).

Certains streptocoques, en particulier les formes courtes, donnent des cultures troubles vers la vingt-quatrième heure à 37°, puis des grumeaux se forment, et vers le troisième ou cinquième jour le liquide s'éclaircit par précipitation d'un dépôt au fond du tube.

Sérum liquide. — Le sérum liquide pur provenant soit du liquide d'ascite, soit du sang du bœuf ou du cheval, convient assez mal au Streptocoque qui y donne des cultures de même aspect que celles en bouillon, mais plus grêles ; au contraire, le sérum frais de lapin permet le développement de cultures très abondantes.

Bouillon-sérum et bouillon-sang. — Marmorek a recommandé les milieux suivants qui permettent d'obtenir des cultures abondantes et virulentes :

1° Bouillon peptonisé, une partie ; sérum de sang humain, une partie ; ce milieu est le plus favorable.

2° Bouillon peptonisé, une partie ; sérum d'ascite ou de pleurésie, une partie.

3° Bouillon peptonisé, une partie ; sérum d'âne, de mulet ou de cheval, deux parties.

Les caractères des cultures sont analogues à ceux que nous avons décrits plus haut.

Lait. — Le Streptocoque cultive dans le lait, qu'il coagule d'ordi-

naire en quatre ou cinq jours; la coagulation est parfois plus lente et peut même manquer.

Gélatine. — La piqûre dans un tube de gélatine donne une culture grêle, constituée par de petits points blancs opaques, arrondis, isolés et arrivant à peine à atteindre le volume d'une tête d'épingle. Il ne se produit jamais de liquéfaction; tout développement s'arrête vers le cinquième jour; la culture meurt en peu de temps.

Gélose. — A 37° il se forme le long de la strie, au bout de douze ou vingt-quatre heures, un léger semis de très petites colonies blanchâtres, que l'on a comparées à des grains de semoule; bientôt ces colonies augmentent de volume; elles peuvent confluer et former une bande peu épaisse, semi-opaque, grisâtre, à bords plus ou moins découpés. La vitalité de la culture disparaît rapidement.



Fig. 166. — Streptocoque pyogène. — Piqûre en gélatine à 22° (5e jour).



Fig. 167. — Streptocoque pyogène. — Strie sur gélose (4e jour).

Sérum solidifié. — Culture analogue à la précédente; les colonies restent plus fréquemment isolées.

Marmorek recommande l'usage de gélose à la surface de laquelle on étend un peu de sérum humain.

Pomme de terre. — Il ne se produit pas de culture apparente, mais en raclant la surface de la pomme de terre on constate une multiplication évidente dans le produit du raclage examiné au microscope; les chaînettes restent toujours très courtes. Marot a observé un streptocoque donnant sur pomme de terre de petites colonies isolées, blanchâtres, visibles à l'œil nu.

ARTICLE III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ. — VIRULENCE.

Vitalité. — Le Streptocoque se conserve mal dans les cultures aérobies; les réensemencements échouent dès la seconde semaine. Au bout de deux ou trois passages successifs sur gélose, la culture ne se développe plus. En bouillon on peut obtenir des passages beaucoup plus nombreux, mais la virulence du microbe disparaît rapidement. Les milieux de Marmorek au sérum conservent mieux la vitalité du Streptocoque; de plus, des cultures sur gélose, paraissant mortes quand on les ensemence dans les milieux ordinaires, se montrent vivantes et pullulent quand on les reporte en bouillon-sérum.

Dans les cultures le Streptocoque est tué par une exposition d'une heure à 52°, et immédiatement à 100°; il est très sensible aux antiseptiques, même les moins énergiques : les vapeurs de chloroforme, par exemple, stérilisent presque instantanément les cultures.

Dans le pus, principalement quand il est desséché, le Streptocoque est plus résistant ; il est tué en quelques minutes par une exposition à la température de 100°, mais il supporte assez longtemps l'action des antiseptiques usuels.

Virulence. — La virulence disparaît rapidement dans les cultures en milieux ordinaires.

On arrive à maintenir la virulence en conservant le Streptocoque à l'abri de l'air ou dans du bouillon additionné de carbonate de chaux, ou plus certainement encore dans les milieux de Marmorek au sérum; dans ces derniers milieux les cultures successives n'exaltent pas la virulence du microbe, mais celui-ci conserve son activité pendant plusieurs générations.

Un streptocoque fourni par un foyer de suppuration, une angine, chez l'homme, peut se montrer dépourvu de toute propriété pathogène vis-à-vis du lapin ; c'est le cas des streptocoques décrits par Veillon (*Streptococcus tenuis*) et par Lingelsheim (*Streptococcus brevis*).

Exaltation de la virulence. — *a.* Roger, Monti, Achalme ont montré que l'on augmente la virulence d'un streptocoque en l'inoculant au lapin en même temps qu'une culture stérilisée de *Proteus vulgaris*.

b. Vincent a constaté que l'association au *Bacille typhique* exalte la virulence du Streptocoque.

Un streptocoque qui, injecté à la dose d'un quart de centimètre cube dans les veines du lapin, ne détermine pas de fièvre, entraîne la mort par septicémie généralisée chez un sujet qui a reçu avant l'inoculation une injection de culture de Bacille d'Eberth; bien plus, les cultures de Bacille typhique stérilisées par filtration et injectées en même temps que le Strep-

tocoque rendent celui-ci beaucoup plus actif : on peut arriver à tuer par septicémie streptococcique un animal aussi résistant que le cobaye en lui injectant dans le péritoine 2 centimètres cubes d'une culture filtrée de Bacille d'Eberth mélangés à 1 centimètre cube d'une culture de Streptocoque non exalté.

c. Marmorek, pour la préparation des toxines, exalte la virulence du Streptocoque par les passages en série chez le lapin. C'est ce procédé que l'on devra utiliser pour obtenir un virus très actif; on opérera de la façon suivante :

Inoculer dans la veine auriculaire d'un lapin une dose mortelle de la culture en bouillon du Streptocoque à exalter. Dès que l'animal est mort, ensemencer le sang du cœur dans un tube bouillon-sérum humain ; après quarante-huit heures de séjour à 37°, inoculer la culture à un deuxième lapin; la culture ensemencée avec le sang de ce deuxième lapin servira à en inoculer un troisième; on continuera ainsi indéfiniment la série, c'est une condition indispensable pour conserver la virulence du microbe. Après deux mois de passages, Marmorek a obtenu une culture en bouillon-sérum si active qu'elle tue encore le lapin à la dose de 1 cent-milliardième de centimètre cube: cette dose infinitésimale, diluée dans 1 centimètre cube de bouillon et injectée dans le péritoine d'un lapin, amène la mort en trente heures par septicémie.

§ 2. — TOXINES.

I. — Roger cultive le Streptocoque à 30°, à l'abri de l'air, dans de la bouillie de viande; au bout de cinq jours la culture est exprimée et filtrée sur porcelaine. Le filtrat injecté dans les veines du lapin, à la dose de 15 à 20 centimètres cubes par kilogramme, tue l'animal en deux jours avec de la diarrhée et de l'amaigrissement. Des lapins ayant reçu 5 à 12 centimètres cubes de culture filtrée, inoculés plus tard (du quinzième au trentième jour) avec une culture virulente, moururent plus vite que les animaux témoins.

Au contraire, le même liquide chauffé à 104° et injecté dans les veines à la dose de 5 à 30 centimètres cubes confère l'immunité aux lapins. Il y aurait donc deux produits dans la culture : l'un, précipitable par l'alcool et détruit à 104°, serait toxique et prédisposant ; l'autre, résistant à 104°, serait immunisant.

II. — Marmorek ensemence le microbe exalté en bouillon-sérum humain; la culture est filtrée sur la bougie au bout de trois mois ; le filtrat, injecté à un lapin de 2 kilos à la dose de 1 centimètre cube, le tue sûrement en trois à quatre jours. L'activité de la toxine est diminuée par le chauffage à 58°.

§ 3. — VACCINATION.

I. **Par la toxine.** — Roger a réussi à vacciner le lapin en lui injectant à plusieurs reprises des cultures stérilisées à 104°-120°. Les

animaux immunisés par ce procédé n'atteignent jamais un degré d'immunisation comparable à celui qu'ils acquièrent au moyen des cultures vivantes (Marmorek).

Marmorek a essayé d'immuniser le cheval en lui injectant des quantités progressives de sa toxine tuant le lapin à la dose de 1 centimètre cube ; un cheval de 300 kilos a reçu 1 260 grammes de cette toxine en quatorze injections en deux mois ; la réaction fut peu marquée et le sérum fourni par l'animal se montra très insuffisant.

II. **Par les cultures vivantes.** — Ce procédé est le plus certain et le plus rapide.

Lapin. — Marmorek a vacciné des lapins en leur inoculant d'abord des cultures anciennes, puis des cultures virulentes à doses progressives.

Les animaux les mieux vaccinés ont été ceux qui ont reçu d'emblée sous la peau de l'oreille une culture assez virulente pour leur donner un érysipèle intense ; un certain nombre d'animaux succombent à cette première inoculation. Jamais cependant les animaux vaccinés solidement par ce procédé n'ont résisté à l'inoculation du Streptocoque exalté actif au cent-millionième. Le sérum de ces lapins, actif contre le Streptocoque qui a servi à l'immunisation, est dépourvu d'influence sur le Streptocoque exalté.

Mironof a obtenu des résultats analogues en donnant à des lapins, d'abord des cultures stériles, puis des cultures virulentes à doses progressives.

Gromakowski a vacciné des lapins par un procédé mixte en leur inoculant dans le péritoine, d'abord une culture ancienne chauffée à 100°, puis une culture ancienne non chauffée (5 à 10 centimètres cubes) et enfin des doses croissantes (1 à 10 centimètres cubes) de cultures virulentes. Entre chaque inoculation il met un intervalle de quinze jours environ et fait une quinzaine d'injections ; les animaux arrivent à supporter dans le péritoine 30 centimètres cubes d'une culture virulente.

Grands animaux. — Marmorek a immunisé l'âne, le cheval et le mouton en leur injectant sous la peau des doses faibles de culture d'un streptocoque extrêmement actif et en répétant les injections à doses croissantes dès que l'animal est rétabli ; chaque inoculation doit être suivie d'une réaction énergique.

Cheval. — Dès le début, injecter sous la peau de l'encolure 0,75 à 2 centimètres cubes de culture virulente en bouillon sérum (quand il faut de grandes quantités de culture on remplace le sérum de sang humain par du sérum d'ascite ou du sérum d'âne) ; la réaction est violente, la température s'élève jusqu'à 40° et il se produit un œdème dur au point d'inoculation. Pour obtenir un sérum efficace, il est nécessaire de provoquer ces

réactions énergiques. Après rétablissement complet de l'animal, on inocule une dose double (5 centimètres cubes par exemple) de la culture virulente ; peu à peu on arrive à faire tolérer à l'animal des doses de 40 centimètres cubes et au-dessus.

Ane. — L'âne est beaucoup plus sensible et réagit très violemment : une dose de 5 centigrammes d'une culture tuant le lapin à la dose de 1 milligramme amena une réaction intense dans une observation de Marmorek; il est bon de débuter par des cultures moins virulentes ; les doses doivent être augmentées très lentement.

§ 4. — SÉROTHÉRAPIE.

Le sérum des chevaux immunisés a été étudié par Roger et surtout par Marmorek.

Préparation du sérum. — Marmorek utilise le cheval comme producteur de sérum ; le cheval immunisé (Voy. plus haut) doit recevoir des quantités considérables de cultures virulentes pour fournir un sérum énergique (au moins 2 litres de cultures donnés par doses croissantes en six à douze mois). La récolte de sang ne devra être pratiquée que quatre semaines après la dernière inoculation (Voy. *Diphtérie* pour les détails de la préparation du sérum).

Quand on immunise le cheval par inoculation de cultures vivantes, pendant toute la durée de la réaction le sang ne contient pas de streptocoques, mais il est toxique : un lapin meurt en huit jours après injection de 2 centimètres cubes de sérum recueilli en période fébrile chez un cheval déjà bien immunisé; le sérum provenant de chevaux en état d'immunisation moins avancé, et recueilli alors que le fièvre était tombée depuis quinze jours, faisait périr les lapins de 1 500 grammes en cinq à dix jours à la dose de 0,5 à 1 centimètre cube. A partir de la troisième semaine après la dernière inoculation, le sérum n'est plus toxique; dès ce moment, et mieux encore après la quatrième semaine, il manifeste un pouvoir curatif et préventif très accusé (Marmorek).

Propriétés du sérum. — Le sérum ainsi obtenu ne manifeste *in vitro* aucun pouvoir bactéricide vis-à-vis du Streptocoque ; ce microbe y pousse comme dans le sérum des chevaux neufs, lentement et peu abondamment. Mélangé au sérum de lapin, le sérum de Marmorek n'empêche pas le développement du Streptocoque : la culture se produit comme dans le mélange de sérum de lapin et de sérum de cheval neuf, et le microbe conserve son entière virulence (Mironoff, Bordet).

Le sérum de cheval immunisé présente à un très faible degré la *propriété agglutinative* : l'agglutination n'apparaît, et encore reste-t-elle très minime, que quand on mélange à une culture un tiers au moins de son volume de sérum (Bordet).

Le sérum de Marmorek est *antitoxique* : 1 centimètre cube de

toxine tuant le lapin en trois ou quatre jours devient inactif quand on y ajoute 3 à 5 centimètres cubes de sérum.

Le sérum est énergiquement *préventif* : à la dose de 2 centimètres cubes, injectée sous la peau du lapin vingt-quatre heures avant l'inoculation de un millionième de centimètre cube d'une culture tuant sûrement au dix-millionième, il préserve cet animal. La propriété préventive se manifeste avec une dose de sérum égale à la 7/1 000e partie du poids de l'animal.

Le sérum préventif a des *propriétés curatives* : 1 centimètre cube de sérum préserve un lapin infecté depuis trois heures avec une dose dix fois mortelle de virus exalté; 5 centimètres cubes guérissent des lapins inoculés depuis cinq heures; quand six heures se sont écoulées depuis l'inoculation avec le virus exalté, le sérum est impuissant à enrayer l'infection; au contraire, avec les streptocoques de virulence ordinaire, le sérum amène la guérison même après vingt-quatre et trente heures.

Pour Behring et Knorr, Marmorek, l'animal immunisé contre une race de streptocoques l'est aussi contre les races voisines et son sérum est actif contre ces dernières. Cette affirmation ne semble pas justifiée par les faits cliniques; de plus, Mery, avec le sérum de Marmorek, n'a pu immuniser le lapin contre un streptocoque provenant du sang d'un scarlatineux. Denys, en immunisant les chevaux avec des mélanges de divers streptocoques, a tenté d'obtenir un *sérum polyvalent* actif contre les différentes races; on ne peut encore se prononcer sur la valeur de ce sérum.

Applications thérapeutiques. — Le sérum de Marmorek a été employé chez l'homme, sans grand succès, pour combattre les affections à streptocoques.

Dans l'érysipèle, la fièvre puerpérale (Chantemesse, Roger, etc.), les résultats n'ont pas été aussi satisfaisants qu'on pouvait l'espérer et trop souvent le sérum s'est montré inactif; les doses employées ont été de 10 centimètres cubes répétées au besoin chaque jour, pendant une semaine et plus ; dans les cas graves, 20 centimètres cubes ont été injectés d'emblée.

Dans la scarlatine, l'usage du sérum de Marmorek a donné des résultats encourageants mais non concluants.

Dans les angines diphtéritiques avec association de Streptocoque, Roux a essayé d'adjoindre au sérum antidiphtérique le sérum de lapins immunisés contre le Streptocoque par Marchoux; ces essais n'ont pas été couronnés de succès ; Martin a obtenu des résultats un peu plus satisfaisants en combinant le sérum de cheval de Marmorek au sérum antidiphtérique, mais « il ne faut pas s'attendre à une action bien positive »; Marmorek, enfin, a essayé d'obtenir un sérum à la fois antidiphtérique et antistreptococcique en immunisant contre le Streptocoque des chevaux déjà vaccinés contre la diphtérie; ces chevaux résistent à merveille aux inoculations de Streptocoque et présentent une réaction minime même sous l'influence de doses considérables de cultures exaltées; ce sérum n'a pas encore fait ses preuves.

CHAPITRE IX

LE STREPTOCOQUE DE LA GOURME

La gourme des équidés est causée par un streptocoque découvert par Schütz (1).

La gourme atteint de préférence les jeunes chevaux de un à cinq ans; ses manifestations les plus ordinaires sont : le catarrhe nasal (*jetage*), la tuméfaction et la suppuration des ganglions de l'auge (*gourmes*) et les lymphangites ; les poumons et les plèvres sont assez souvent envahis, on peut observer la pleurésie purulente, quelquefois même la maladie se généralise et prend la forme d'une septicémie avec abcès métastatiques. Le Streptocoque de Schütz se rencontre dans le jetage, les ganglions et abcès gourmeux, le pus pleural, les lésions pulmonaires, etc.

Article I. — GOURME EXPÉRIMENTALE.

La *souris blanche* est très réceptive : après inoculation sous-cutanée il se forme un abcès au point d'inoculation, puis apparaissent des traînées de lymphangite et les ganglions voisins se prennent ; on peut observer comme chez le cheval des lésions pleuro-pulmonaires et des abcès viscéraux. Dans toutes ces lésions se rencontre le Streptocoque à l'état pur ; le sang ne contient que peu de germes : les cultures sont nécessaires pour y déceler leur présence.

Le *cheval* peut être infecté expérimentalement ; l'inoculation sous-cutanée, l'injection intraveineuse produisent des abcès gourmeux ; par inoculation dans les fosses nasales (friction avec un tampon imbibé de culture), on obtient une maladie analogue à la gourme spontanée (Schütz, Sand et Jensen).

Le *lapin* est peu sensible ; pour l'infecter, il paraît nécessaire d'employer la voie intraveineuse.

Le *cobaye* est réfractaire.

Matériaux d'inoculation. — On emploiera de préférence une

(1) Le Streptocoque de la gourme est très voisin de celui de l'érysipèle ; certains auteurs (Cappeletti et Vivaldi, etc.), croient que ces deux microbes ne constituent que deux variétés d'une même espèce.

culture récente, de premier passage, en bouillon, ou encore du pus gourmeux.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le microbe de la gourme se présente sous l'aspect d'un coccus rarement isolé, ordinairement groupé en chainettes ; tantôt les chaînettes sont courtes, composées de trois ou quatre grains, tantôt elles sont longues, sinueuses, formées par un grand nombre de micrococques. Chaque élément mesure 0,7 à 0,9 μ de diamètre ; il est fréquent de voir dans les chaînettes des coccus ovalaires à grand axe transversal. Dans les cultures sur sérum, les microcoques apparaissent souvent, après coloration, entourés d'une capsule. Nous avons observé nettement cette capsule sur les streptocoques qui fourmillaient dans le pus d'une pleurésie gourmeuse.



Fig. 168. — Pus gourmeux du cheval.

Coloration. — Le Streptocoque de la gourme se colore aisément par les couleurs basiques d'aniline. Il prend le Gram. On utilisera de préférence le bleu de Kühne et surtout la thionine phéniquée ; le pus gourmeux donne de très belles préparations par la double coloration de Gram.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Streptocoque de la gourme est aérobie indifférent. D'après Schütz, il ne cultive qu'en bouillon et sur sérum. Nocard, Sand et Jensen ont montré qu'il poussait également sur gélose et gélatine; cependant ces cultures ne s'obtiennent pas toujours et restent en général grêles. Le Streptocoque cultive mal au-dessous de + 20° ; le température optima est de 37° environ.

Bouillon. — Le bouillon glycériné convient le mieux ; la culture est analogue à celle du Streptocoque de l'érysipèle ; il ne se produit

pas de trouble, mais on voit des petits flocons blancs qui se précipitent bientôt au fond du tube.

Gélose. — Nocard, Sand et Jensen ont réussi à obtenir des cultures sur gélose inclinée, contrairement à ce qu'avait constaté Schütz. Les cultures se développent mieux quand on fait l'ensemencement en piqûre profonde. Nous avons eu entre les mains un Streptocoque gourmeux qui cultivait assez abondamment, pendant deux ou trois générations, en strie sur gélose. Sur la strie se développent des colonies lenticulaires demi-transparentes, ne dépassant jamais les dimensions d'une tête d'épingle.

Gélatine. — La culture en strie a échoué entre les mains de Schütz et de Poels. Sand et Jensen ont obtenu des cultures par piqûre et en surface, ces dernières étaient excessivement grêles. Avec le streptocoque mentionné plus haut, nous avons obtenu une culture nette en strie sur gélatine à + 22° ; les colonies étaient isolées, transparentes et au nombre d'une dizaine au niveau de la strie, le réensemencement sur gélatine tenté le huitième jour a échoué.

Pomme de terre. — Nous n'avons jamais obtenu de développement apparent.

Sérum. — Sur sérum incliné, le Streptocoque de la gourme se développe assez abondamment ; les petites colonies lenticulaires, semi-transparentes du début confluent bientôt en une couche grisâtre, irisée, assez épaisse ; les coccus de la culture présentent souvent une capsule très nette.

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — Le Streptocoque de la gourme semble doué d'une assez grande fragilité. Nous avons constaté qu'une culture en bouillon très active avait perdu sa vitalité et sa virulence au bout de douze jours. Les réensemencements en série sur gélose ou gélatine échouent presque toujours : avec un microbe poussant bien sur gélose quand il venait du bouillon, nous avons obtenu une culture très grêle au deuxième passage sur gélose et à peu près nulle au troisième ; les réensemencements sur gélatine ont toujours échoué.

Immunité. — La gourme spontanée ne confère qu'une immunité passagère. Sand et Jensen ont obtenu artificiellement l'immunisation chez le cheval par injection intraveineuse d'une culture virulente : il se formait un abcès gourmeux et l'animal devenait réfractaire à l'inoculation par la voie nasale.

CHAPITRE X

I. — LE STREPTOCOQUE DE LA MAMMITE CONTAGIEUSE DES VACHES LAITIÈRES

Nocard et Mallereau ont montré que la mammite contagieuse des vaches laitières est causée par un streptocoque que l'on trouve en abondance dans le lait des animaux malades.

La mammite est caractérisée par l'apparition d'une induration de la glande, induration qui peut atteindre le volume du poing et même envahir tout l'organe. La maladie a une marche chronique et ne compromet pas la vie de l'animal; la propagation se fait par la main de la personne chargée de la traite qui transporte le virus de pis à pis.

Le lait présente des altérations caractéristiques : à l'examen microscopique on y voit de nombreuses chaînettes de coccus et des globules de pus; sa réaction est parfois acide, parfois aussi il présente au moment de la traite les caractères du lait normal, mais il devient acide et se coagule avec une grande rapidité. Si on le recueille purement dans des tubes flambés (Voy. p. 34 C.) et qu'on laisse ces tubes à la température de la chambre, le lait ne tarde pas à se coaguler, devient acide et les streptocoques y pullulent.

Article I. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

Le Streptocoque est inoculable à la *vache* et à la *chèvre ;* il suffit d'injecter dans le trayon de ces animaux un peu d'une culture récente ou de lait altéré par le microbe pour voir se développer une mammite analogue à l'affection spontanée. Les animaux de laboratoire ne sont pas réceptifs.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

L'agent de la mammite est un coccus de 1 μ environ de diamètre, rond ou légèrement ovoïde, associé en chaînettes. Ces chaînettes sont très longues dans les cultures où elles dépassent fréquemment le champ du microscope, moins longues dans le lait et les tissus malades.

Coloration. — Le Streptocoque de Nocard se colore bien par les couleurs basiques d'aniline, il se décolore aisément et prend mal le Gram. Les lamelles préparées avec une gouttelette de lait étalée et desséchée ou un peu de culture seront colorées par la thionine ou le bleu phéniqués.

Les coupes de la mamelle seront traitées par le bleu phéniqué et le tanin (Voy. p. 226).

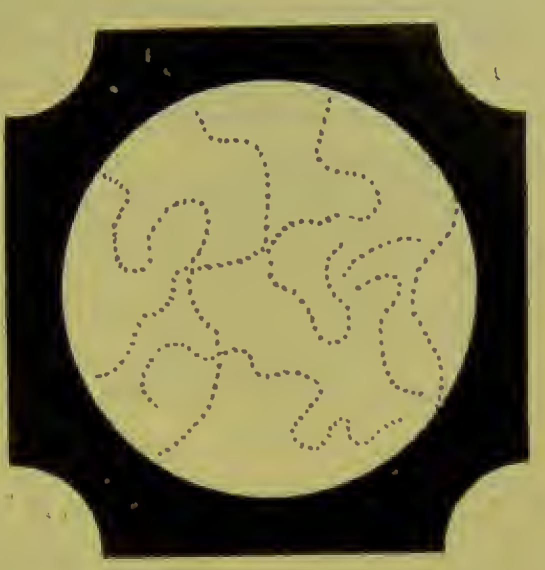


Fig. 169. — Streptocoque de la mammite contagieuse. — Culture en bouillon. Thionine phéniquée (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Streptocoque de la mammite est aérobie indifférent; les milieux ordinaires, sauf légères modifications, lui conviennent; il pousse à la température de la chambre; la température optima de culture est de + 35° à 37°.

Lait. — Le Streptocoque se développe rapidement dans le lait en le coagulant et lui communiquant une réaction acide.

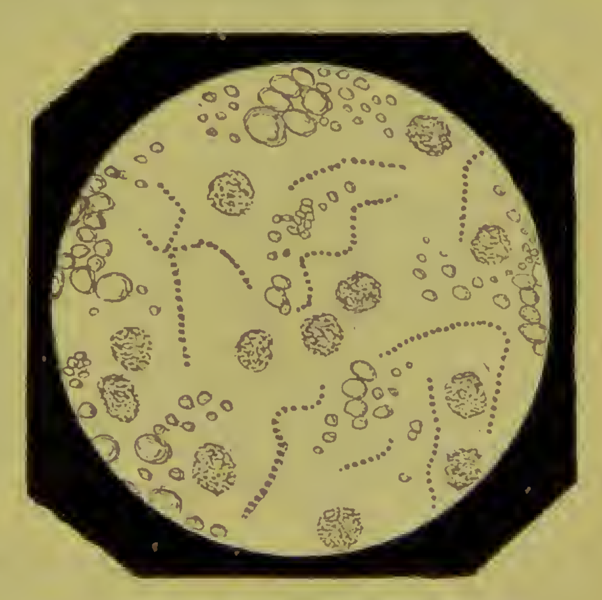


Fig. 170. — Lait de vache affectée de mammite contagieuse.

Bouillon. — Le bouillon le plus favorable est l'eau de viande (Voy. p. 30) additionnée de 2 à 4 p. 100 de glucose ou de lactose; dans ce milieu à 37°, il se forme rapidement un petit dépôt blanchâtre, floconneux ou non, constitué par de longues chaînettes; au repos la culture reste limpide, mais elle se trouble par une légère agitation.

Le bouillon prend rapidement une réaction acide très prononcée qui entrave la culture ; on a une culture plus riche et plus vivace

en ajoutant 2 p. 100 de carbonate de chaux (Voy. p. 33) : tandis que dans les milieux ordinaires la vitalité disparaît en quelques semaines, en milieu carbonaté le bacille peut rester vivant plusieurs mois.

Gélatine. — En *piqûre* dans un tube de gélatine, il se produit vers le troisième ou quatrième jour de petites colonies blanchâtres, opaques, rondes, confluant bientôt en une ligne épaisse. La gélatine n'est jamais liquéfiée.

En *strie*, se développent des colonies petites, rondes, translucides, pouvant confluer en une pellicule plus épaisse sur les bords qu'au centre.

Gélose. Sérum. — Sur gélose et sérum les stries ont les mêmes caractères, mais le développement est plus grêle.

Pomme de terre. — Culture nulle ou peu marquée.

II. — LE COCCUS DE LA MAMMITE GANGRENEUSE DES BREBIS

De la mammite de la vache laitière nous rapprocherons, pour la commodité de l'étude, la mammite des brebis, malgré les différences morphologiques qui séparent leurs agents.

Nocard a établi que la mammite gangreneuse des brebis laitières (*araignée*, *mal de pis*) est produite par un coccus qui n'a aucune tendance à s'associer en chaînettes.

La mammite des brebis est ordinairement mortelle en vingt-quatre à quarante-huit heures ; la mamelle est dure, chaude, rouge et douloureuse, puis la lésion s'étend dans le tissu cellulaire sous-cutané des cuisses et du tronc, la peau s'infiltre de sérosité et prend une teinte érysipélateuse, les parties envahies se gangrènent et la mort survient. Dans le lait, la glande malade, le liquide œdémateux et roussâtre du tissu cellulaire et de la cavité péritonéale, se trouve en abondance le Coccus de Nocard. La contagion se fait peut-être par la main du trayeur ; cependant Nocard a échoué à reproduire la maladie en badigeonnant le pis des brebis saines avec une culture virulente, tandis que l'injection de quelques gouttes de cette culture dans les conduits galactophores, pratiquée sans éraillure de la muqueuse, provoque le développement de la mammite.

Article I. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

La *brebis* contracte facilement l'infection par injection de quelques gouttes de lait altéré ou d'une culture âgée d'un jour dans les trayons ou la substance de la glande.

La chèvre et les animaux de laboratoire ne sont pas réceptifs ; le

lapin, cependant, fait un abcès au point d'inoculation mais ne succombe pas.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le microbe de la mammite des brebis est un très petit coccus de 0,2 μ environ de diamètre ; il se groupe par deux, par quatre, ou en petits amas ; on peut difficilement l'observer sans coloration, mais il se colore très bien par les couleurs basiques d'aniline. Il prend le Gram.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Coccus de Nocard est aérobie indifférent ; il pousse dans les milieux ordinaires de culture, neutres ou alcalins. Il cultive à la température ordinaire et mieux entre 35° et 39°. Pour lui conserver sa virulence il faut faire des réensemencements journaliers en prenant la semence dans la culture de la veille. Comme le Streptocoque de la mammite de la vache, il conserve plus longtemps sa vitalité dans le bouillon carbonaté que dans le bouillon ordinaire.

Lait. — Le coccus se développe dans le lait en le coagulant dès la vingt-quatrième heure, et en lui communiquant une réaction fortement acide.

Bouillon. — Dans le bouillon ordinaire ou glucosé, il donne un trouble marqué et un abondant dépôt blanc en même temps que la culture devient fortement acide.

Gélatine. — En *piqûre*, le coccus se développe rapidement ; à 20°, la liquéfaction commence dès le deuxième jour, elle s'enfonce en cône dans la profondeur ; dans les couches superficielles, la totalité du milieu est liquéfiée et trouble.

Gélose. — Sur gélose, la strie donne un revêtement épais, envahissant, d'abord blanc puis un peu jaunâtre.

Pomme de terre. — Sur la pomme de terre, le développement reste grêle : il se forme une couche grisâtre, festonnée, prenant peu à peu une teinte jaune.

CHAPITRE XI

LE GONOCOQUE DE NEISSER

Le Gonocoque est l'agent de la blennorragie (Neisser) ; on le rencontre dans le pus urétral (1), le pus des vaginites et des différentes complications génitales de la blennorragie (bartholinites, salpingites, métrites) ; il détermine certaines cystites, des affections suppuratives du petit bassin chez la femme, l'ophtalmie blennorragique et l'ophtalmie purulente des nouveau-nés. Hallier l'a rencontré dans le sang d'individus atteints de rhumatisme blennorragique (gonococcie) ; Ghon et Schlagenhaufer dans les lésions de l'endocardite blennorragique, Petrone et Kammerer dans le pus d'arthrites blennorragiques, mais on a échoué à le déceler dans les articulations atteintes de rhumatisme blennorragique. Il a été signalé dans le pus de la rectite blennorragique et d'une stomatite de même nature (Jesioneck).

Pendant la première période de la blennorragie, le Gonocoque existe d'ordinaire à l'état pur dans l'urètre, mais bientôt il se produit des infections secondaires et de nouveaux microbes viennent s'associer ou se substituer au gonocoque (*Bacterium coli*, microbes de la suppuration, diplocoques, microbes divers décrits par Bumm, Eraud et Hugounenq, Steinschneider, Legrain, Eisenberg, Bosc, etc.). Ces microbes associés peuvent causer diverses complications de la blennorragie : abcès, suppurations, endocardites, etc.

Article I. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

§ 1er. — RÉCEPTIVITÉ. — SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

Homme. — *a.* Welander a déterminé une blennorragie chez l'homme en injectant dans l'urètre du pus à Gonocoques.

(1) Il existe un certain nombre d'urétrites non gonococciennes (urétrites pseudo-gonorrhéiques de Bockart), parmi lesquelles nous citerons les urétrites dues aux caustiques, aux microbes ordinaires de la suppuration, staphylocoques, streptocoques (Bockart), à l'herpès génital, au *Bacterium coli* (Van der Bluyn et Haay, Besson), à la goutte, au rhumatisme, à la syphilis, à la tuberculose, etc. Les urétrites des animaux (chien, etc.) relèvent de microbes différant du Gonocoque.

b. Bumm, inoculant une culture pure de Gonocoque dans l'urètre d'une femme, obtint une blennorragie typique qui dura trois semaines; le pus de l'urètre contenait le microbe spécifique.

c. Bockart a injecté dans l'urètre d'un paralytique général à la dernière période un centimètre cube d'une quatrième culture de Gonocoque sur gélatine. Il en résulta une blennorragie typique suivie d'une néphrite suppurée, le Gonocoque se retrouvait dans le pus de l'urètre et des abcès du rein.

d. Bokaï inocula des cultures pures dans l'urètre de six étudiants et obtint six fois une blennorragie. Brenner, Wertheim, Finger, Schlagenhaufer, Kiefer, obtinrent également des résultats positifs.

Animaux. — Les animaux sont peu sensibles à l'inoculation du Gonocoque.

L'inoculation sous-cutanée produit une inflammation passagère non suivie d'abcès (Wertheim). Finger a cependant obtenu une fois un petit abcès.

Les inoculations urétrales échouent à produire la blennorragie chez le chien, le lapin, le cheval et le singe.

Legrain a obtenu chez le cobaye une légère conjonctivite purulente avec des gonocoques à l'intérieur des cellules de pus. Chez les jeunes lapins, le Gonocoque produit une conjonctivite purulente typique ; cependant le microbe, loin de se multiplier, disparaît rapidement de la conjonctive oculaire ; l'inflammation est produite par la toxine : les cultures stérilisées la produisent (Morax).

En inoculant des cultures dans les articulations du lapin, Finger, Schlagenhaufer ont obtenu des arthrites aiguës éphémères.

§ 2. — RECHERCHE DU GONOCOQUE.

On recherche le Gonocoque dans le pus de l'urétrite et des diverses suppurations blennorragiques.

Pour recueillir le pus urétral, désinfecter le méat, faire sourdre une goutte de pus en comprimant la verge de la racine à l'extrémité et recueillir cette gouttelette avec une pipette ou une öse.

a. **Examen microscopique.** — Dans la confection des lamelles de pus, avoir soin de ne pas comprimer fortement la goutte de pus entre les deux lamelles et d'opérer très doucement la séparation de celles-ci pour ne pas briser les cellules de pus, ce qui mettrait les Gonocoques en liberté et leur ferait perdre un de leurs meilleurs caractères. Colorer la préparation selon les procédés exposés plus loin, de manière à différencier le Gonocoque des espèces associées.

b. **Cultures.** — Pour obtenir des cultures, il est bon de prélever

le pus pendant les premiers jours de l'urétrite ; plus tard, la production d'infections secondaires rendrait la recherche moins aisée. On pratiquera de préférence l'ensemencement en strie sur des plaques de gélose au sérum, de façon à obtenir des colonies séparées ; on peut aussi faire un isolement par la méthode ordinaire sur plaques de gélatine acide (Voy. p. 326).

Remarque. — Dans la blennorragie chronique, alors que l'écoulement est réduit à une simple goutte, le meilleur procédé pour rechercher le Gonocoque consiste à faire uriner le malade, au réveil, dans un verre conique ; on ajoute un fragment de thymol et on laisse au repos. Bientôt des filaments blanchâtres de mucus ou de muco-pus se déposent au fond du verre ; on prélève de ces filaments avec une pipette et on en prépare des lamelles que l'on traite comme plus haut.

Ce mode de recherche ne se prête pas à l'obtention des cultures ; pour obtenir celles-ci, il faudrait recueillir purement l'urine dans un verre stérile, y prélever immédiatement un filament avec une pipette stérile et l'ensemencer sur gélose au sérum.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Gonocoque se présente sous forme de petits grains ayant l'aspect de reins ou de haricots ; leur diamètre varie de 0,4 à 0,6 μ ; ils sont d'ordinaire réunis par deux, les éléments accouplés se regardent par leur face concave ; quelquefois, on trouve des groupements en amas, mais jamais de chaînettes. Dans les cultures, les grains, très inégaux, sont arrondis ou ovalaires.

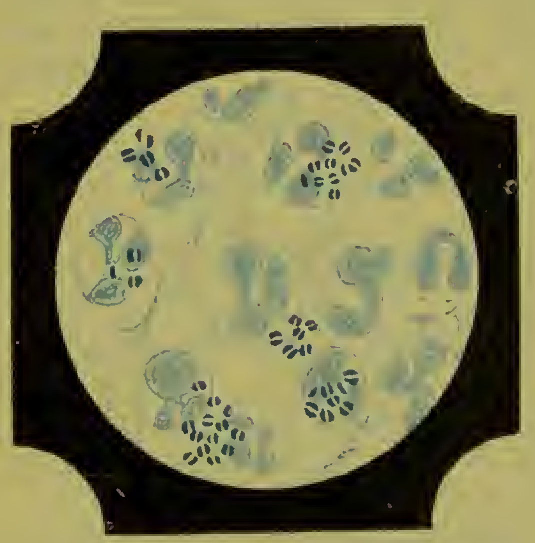


Fig. 171. — *Gonococcus Neisseri* (pus de blennorragie). — Bleu phéniqué (Reich. ; Obj. 1/12 imm. ; Oc. III).

Les deux éléments d'un couple sont réunis par une gangue muqueuse, analogue à la capsule du Pneumocoque, très difficilement visible ; on arrive à la colorer dans les cultures âgées en se servant de la fuchsine de Ziehl.

Dans les cultures, les gonocoques présentent des mouvements d'oscillation et de translation (Eraud et Hugounenq).

Dans le pus blennorragique, les Gonocoques sont quelquefois libres, mais plus souvent contenus dans les cellules de pus ou les

cellules épithéliales ; cette inclusion du Gonocoque dans les cellules constitue une des caractéristiques de ce microbe.

Dans le pus de l'urétrite, le Gonocoque se rencontre à l'état de pureté pendant les premiers jours ; au début, les microbes sont peu nombreux et se trouvent dans les leucocytes polynucléaires ; les cellules épithéliales abondent, mais un très petit nombre d'entre elles contiennent des microbes ; vers le troisième jour le nombre des gonocoques augmente, beaucoup de cellules du pus contiennent le microbe; bientôt après, les cellules épithéliales disparaissent, un à cinq sur six des globules de pus renferment des Gonocoques, très peu de ceux-ci sont libres. Dès ce moment, on peut constater l'entrée en jeu de microbes associés. Plus tard, les cellules épithéliales redeviennent très nombreuses, peu d'entre elles contiennent le Gonocoque ; ce n'est que quand l'écoulement passe à l'état chronique que les cellules épithéliales présentent de nouveau de nombreux microbes à leur intérieur, les globules du pus disparaissent alors presque complètement.

Coloration. — Le Gonocoque se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline, mais il ne prend pas le Gram. *L'absence de coloration par la méthode de Gram sert de base au diagnostic* (G. Roux).

A. Faire d'abord une coloration simple avec la fuchsine de Ziehl diluée ou la thionine phéniquée ; tous les microbes se colorent.

B. Colorer une lamelle au violet phéniqué, l'examiner, puis lui faire subir la méthode de Gram ; les Gonocoques se décolorent, seuls les microbes associés tels que les Staphylocoques, le diplocoque décrit par Legrain, Bumm, etc., restent colorés.

C. Faire subir à une lamelle la double coloration par un des procédés basés sur le principe suivant : on fait une méthode de Gram, les microcoques résistant au Gram sont seuls colorés, puis on fait agir une solution colorante autre que le violet et les Gonocoques prennent cette deuxième teinte.

Procédé de Steinschneider. — 1° Faire agir le violet d'Ehrlich, puis la solution de Gram, décolorer à l'alcool absolu, laver à l'eau.

2° Faire agir alors pendant une minute une solution aqueuse de vésuvine ; laver, sécher, monter.

Les Gonocoques et le fond sont colorés en brun, les microbes résistant au Gram ont une teinte violette.

Procédé de Nicolle (procédé recommandé). — 1° Faire agir le violet phéniqué, le liquide de Gram, puis décolorer par l'alcool-acétone (p. 145), laver à l'eau.

2° Faire agir alors pendant quelques secondes une goutte d'une solution hydro-alcoolique de fuchsine :

Solution saturée de fuchsine dans l'alcool à 95°. 5 centimètres cubes.
Eau distillée.................................. 100 —

Laver, sécher, monter. Les Gonocoques sont colorés par la fuchsine, les autres microbes sont violets.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Gonocoque est aérobie ; il cultive assez difficilement et exige des milieux spéciaux. Il se développe entre + 21° et 39°, la température optima est comprise entre 36° et 37°. Les milieux à base de sérum donnent les meilleurs résultats.

Bouillon. — Dans le bouillon ordinaire à 36°-37°, le développement est insignifiant; vers le deuxième jour, il se produit un trouble, puis un léger dépôt grisâtre se précipite et le liquide s'éclaircit.

Urine (Finger). — Dans l'urine non alcalinisée, additionnée de 0,5 p. 100 de peptone et stérilisée, le Gonocoque se développe mieux que dans le bouillon : il produit un trouble notable et un précipité assez abondant. Hammer emploie de préférence une urine fortement albumineuse, stérilisée à l'autoclave ou par filtration sur porcelaine.

Gélatine acide (Turro). — Le Gonocoque se développe assez bien à 22° sur la gélatine acide (gélatine ordinaire non alcalinisée), mais les cultures sont fragiles et le développement s'arrête dès le troisième ou quatrième passage. Il ne se produit pas de liquéfaction.

Piqûre. — Au bout de plusieurs jours, apparition d'une très légère ligne blanche le long de la piqûre ; la culture reste maigre.

Colonies isolées. — Petites colonies punctiformes, saillantes, blanches, à surface hémisphérique, restant très limitées.

Gélose ordinaire. — En ensemençant en strie une certaine quantité de pus blennorragique sur de la gélose ordinaire, on obtient un développement très grêle ; le microbe emprunte au pus lui-même les matériaux albuminoïdes qui lui sont nécessaires; on obtient ainsi une couche vernissée très mince. La culture a peu de vitalité ; les passages successifs sur gélose sont impossibles, le développement ne se produisant plus dès le deuxième passage.

Gélose de Wertheim. — Liquéfier par la chaleur des tubes de gélose stérilisée (environ 6 centimètres cubes de gélose par tube) ; faire refroidir à + 45° et ajouter purement au contenu de chaque tube environ 4 centimètres cubes de sérum humain ou de liquide d'ascite stérile. Mélanger par agitation, puis incliner le tube et le laisser refroidir ; ensemencer après solidification.

Strie. — A 37° les ensemencements en strie donnent au bout de deux à trois jours une bandelette étroite, mince, grisâtre, demi-transparente, à surface humide et brillante.

Colonies isolées. — On peut couler la gélose de Wertheim dans des boîtes de Petri, l'y laisser solidifier, puis pratiquer à la surface des ensemencements en strie sans recharger l'öse (p. 89). A 37°, dès la vingt-quatrième heure, apparaissent de petites colonies punctiformes, transparentes ; les colonies s'étendent ensuite et vers le deuxième ou quatrième jour, elles ont la dimension d'une tête d'épingle, leurs bords sont légèrement sinueux (examen à la loupe), leur surface est hémisphérique et leur centre devient blanchâtre, semi-opaque.

Gélose de Kral. — Kral remplace dans la gélose de Wertheim le sérum humain par le sérum de veau et obtient un développement analogue à celui que nous venons de décrire.

Gélose de Pfeiffer. — Ghon et Schlagenhaufer employent le milieu de Pfeiffer, aisé à préparer : sur des plaques de gélose, on étend quelques gouttes de sang humain pur et frais. Les caractères de la culture sont les mêmes que ceux décrits plus haut.

Gélose-sang. — Ce milieu (Voy. p. 55) convient fort bien à la culture du Gonocoque (Bezançon et Griffon).

Gélose de Heiman. — Mélange de deux parties de gélose ordinaire et d'une partie de sérum de pleurésie stérilisé par chauffage discontinu (Voy. p. 47). Le milieu doit être neutre : si le sérum est alcalin, il sera mélangé à une gélose légèrement acide.

Gélose de Nasstikoff. — Recommandée par Steinschneider. Un jaune d'œuf recueilli purement (Voy. p. 55) est mélangé intimement à trois fois son volume d'eau stérilisée. Liquéfier par la chaleur des tubes de gélose stérilisée (6 centimètres cubes de gélose par tube) ; laisser refroidir à + 45° et ajouter purement au contenu de chaque tube 2 centimètres de l'émulsion de jaune d'œuf. Mélanger doucement, incliner le tube et laisser refroidir.

Gélose de Steinschneider. — S'obtient en mélangeant une partie d'urine humaine recueillie purement et deux parties de gélose stérilisée (opérer comme pour la gélose de Wertheim).

Sérum de Bumm. — Bumm utilise le sérum de sang humain solidifié ; il recueille purement du sang pendant l'accouchement : aussitôt après la section du cordon, on lave au sublimé l'extrémité placentaire de celui-ci, le placenta restant dans l'utérus ; puis on dispose sous cette extrémité l'orifice d'un ballon flambé et on y recueille le sang qui s'écoule. On peut ainsi obtenir jusqu'à 100 centimètres cubes de sang ; ce sang abandonne au bout de dix-huit à vingt-quatre heures un sérum parfaitement clair, qui est solidifié par le procédé ordinaire.

Il est plus aisé d'utiliser du sang aspiré dans une veine de l'avant-bras (Voy. p. 193). Les caractères de la culture sur sérum humain

sont les mêmes que ceux de la culture sur gélose de Wertheim.

De Christmas remplace le sérum humain par le sérum de lapin coagulé dans des tubes de petit diamètre.

Pomme de terre. — Pas de développement.

ARTICLE III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ. — VIRULENCE.

Le pus blennorragique est stérilisé en quelques minutes par une exposition à la température de + 55°; de même le séjour pendant quelques heures à la glacière à 0° arrête définitivement le développement des cultures. L'exposition à l'air et la dessiccation stérilisent rapidement le pus à Gonocoque. Le microbe ne résiste pas aux antiseptiques les plus faibles.

Les cultures présentent une vitalité minime; le microbe y meurt en deux ou trois semaines; les ensemencements en série deviennent rapidement infertiles; en général, les tubes restent stériles après quatre à cinq passages.

Les cultures récentes en milieux favorables sont virulentes, mais cette virulence est très éphémère; les lésions produites chez les animaux par les cultures relèvent uniquement de la toxine qu'elles contiennent.

§ 2. — TOXINE.

La toxine du Gonocoque a été étudiée par de Christmas; les recherches de Christmas ont été confirmées par Wassermann et Nicolaysen qui ont montré que la toxine se trouve confinée presque exclusivement dans le corps du Gonocoque, d'où elle ne diffuse que très lentement dans le milieu ambiant.

Préparation. — De Christmas a d'abord utilisé comme milieu de culture un mélange de liquide d'ascite (un tiers) et de bouillon peptonisé (deux tiers). Aujourd'hui il préfère un mélange d'eau de viande et de liquide d'ascite. Après développement, la culture est filtrée.

Faire macérer pendant quelques heures, dans un litre d'eau tiède, 500 grammes de viande de veau fraîche et hachée; ne pas ajouter de sel; ajouter à volonté 2 à 3 grammes de gélatine. Chauffer ensuite à 105° pendant une demi-heure; filtrer, concentrer au quart du volume primitif, stériliser. Mélanger 25 parties de ce bouillon à 75 parties de liquide d'ascite.

Le Gonocoque pousse mal dans ce milieu si on ne l'y a pas accoutumé par des passages successifs en bouillon additionné du quart, puis de moitié de son volume de liquide d'ascite. Après accoutumance, la résis-

tanée et la fonction toxigène du microbe augmentent : la survie du Gonocoque dans le liquide de Christmas est de quarante à cinquante jours. L'ensemencement sera pratiqué avec une culture sur sérum de lapin âgée de deux à trois jours.

Douze heures après l'ensemencement, la culture devient trouble, il se forme un voile crémeux à la surface, puis le liquide s'éclaircit et il se dépose une couche grisâtre et visqueuse émettant des prolongements flottant dans le liquide.

Le maximum de toxicité est atteint vers le vingtième ou trentième jour à 37°.

Propriétés. — La toxine possède les propriétés générales des diastases : l'alcool fort, le sulfate ammonique la précipitent des cultures filtrées ; elle est soluble dans la glycérine. Elle tolère un chauffage de quinze minutes à 65°, s'altère entre 65° et 75° et est rapidement détruite à 75°-80°. Elle ne dialyse pas à travers le parchemin.

La gonotoxine est très active pour les animaux de laboratoire réfractaires au Gonocoque.

L'inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale de 1 à 2 centimètres cubes de toxine tue parfois le cobaye ; d'ordinaire il faut 5 à 10 centimètres cubes de toxine dans le péritoine pour amener la mort de cet animal. Sous la peau du cobaye et du lapin, l'inoculation est suivie de la formation d'un abcès bientôt envahi par des microbes d'infection secondaire.

Dans la plèvre du lapin, l'injection de toxine produit un épanchement purulent stérile.

La gonotoxine injectée dans la substance cérébrale à la dose de 1/500e de centimètre cube tue le cobaye en quatre à six heures ; des doses moindres n'amènent pas la mort et confèrent à l'animal une forte immunité qui lui permet de résister à de nouvelles inoculations intracérébrales. De fortes doses de toxine injectées sous la peau à de nombreuses reprises finissent par immuniser contre l'inoculation intracérébrale.

Chez l'homme, on obtient une urétrite manifeste en injectant dans la partie antérieure de l'urètre et y laissant deux à trois minutes 2 centimètres cubes d'une dilution de toxine au dixième.

Sérum antitoxique. — La chèvre ayant reçu dans le tissu cellulaire sous-cutané de fortes doses de gonotoxine a un sérum antitoxique.

Le mélange de toxine et de sérum antitoxique est inactif : la neutralisation ne s'accomplit pas immédiatement, elle exige trois à quatre heures à 15°. Un demi-centimètre cube du sérum obtenu par de Christmas neutralise 10 centimètres cubes de toxine.

Injecté isolément dans le cerveau avant la toxine, le sérum préserve l'animal pendant trois jours contre l'injection intracérébrale de toxine ; injecté après la toxine, il est sans effet préservatif ou thérapeutique.

Injecté sous la peau, dans les veines ou le péritoine, à forte dose (1 à 5 centimètres cubes), le sérum a des propriétés préventives à condition que l'inoculation de toxine ne soit faite qu'au bout de quarante-huit heures.

CHAPITRE XII

LE BACILLE DU PUS BLEU

L'agent des suppurations bleues a été découvert par Gessard.

Les suppurations bleues, très fréquentes avant l'antisepsie, sont plus rares aujourd'hui ; toujours le Bacille pyocyanique se trouve associé dans le pus bleu aux microbes ordinaires de la suppuration ; sa présence constitue simplement une complication des plaies, complication d'ailleurs peu grave.

Le Bacille pyocyanique est capable d'envahir l'organisme humain quand une maladie préexistante lui ouvre une porte d'entrée ; c'est ainsi qu'on l'a rencontré dans les organes d'un homme atteint de fièvre typhoïde ; Calmette l'a trouvé dans le sang de sujets atteints de dysenterie chronique ; on connaît une vingtaine d'observations d'infections généralisées à Bacille pyocyanique (Ehlens, Neumann, Karlinsky, Œttinger, Schimmelsbuch, Kossel, Lartigau).

On trouve quelquefois le Bacille pyocyanique dans le sol, les eaux ; Besson a signalé sa présence presque constante dans les eaux de la régence de Tunis, région où les suppurations bleues sont très fréquentes.

Article I. — MALADIE PYOCYANIQUE EXPÉRIMENTALE.

§ 1er. — ANIMAUX RÉCEPTIFS.

Le cobaye, le rat, la souris sont très réceptifs vis-à-vis du Bacille de Gessard ; ils succombent à l'inoculation sous-cutanée de petites doses de cultures en bouillon.

Le lapin est plus résistant ; il ne succombe pas d'ordinaire après l'inoculation sous-cutanée ; l'inoculation intrapéritonéale donne des résultats inconstants, mais l'injection intraveineuse de 1 centimètre cube de culture amène la mort en vingt-quatre à quarante-huit heures. Les inoculations en série chez le lapin exaltent la virulence du microbe, si bien qu'après quelques passages on obtient un bacille tuant rapidement à la dose de $0^{cc},1$ de culture en bouillon.

§ 2. — SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

Quand on injecte à un lapin 1 centimètre cube de culture en bouillon dans la veine de l'oreille, l'animal fait une maladie aiguë, il présente de la fièvre, de l'albuminurie, de la diarrhée ; les microbes sont peu abondants dans le sang, mais très nombreux dans les reins.

L'inoculation de doses plus faibles de culture confère au lapin une maladie chronique caractérisée par de l'amaigrissement et des paralysies des membres, accompagnées de contractures. L'animal peut guérir ; quand la mort survient, il n'est pas rare de trouver à l'autopsie une véritable néphrite avec petit rein contracté et même de l'hypertrophie du ventricule gauche du cœur. Dans certains cas, on trouve une dégénérescence amyloïde des reins, des infarctus des muqueuses digestives (Charrin).

L'inoculation sous-cutanée, chez le cobaye, produit une tuméfaction locale suivie d'une ulcération, puis le bacille se généralise et la mort survient. L'inoculation intrapéritonéale est plus sévère, la mort est rapide et le sang renferme le bacille.

Un bacille que nous avons isolé de l'eau tuait le rat blanc en vingt à trente-six heures à la dose de $0^{cc},20$ inoculée sous la peau ; à l'autopsie, les organes abdominaux étaient fortement congestionnés, le péritoine contenait un peu de sérosité à peine louche et l'intestin présentait de nombreuses plaques de Peyer en voie d'ulcération ; deux fois les animaux ont eu des hématuries ; le bacille existait dans le sang, le foie, la rate, les reins, le liquide péritonéal, le contenu intestinal, etc. ; chez les deux rats ayant présenté des hématuries, le bacille existait dans l'urine recueillie dans la vessie.

§ 3. — RECHERCHE ET DIAGNOSTIC.

La présence du Bacille pyocyanique dans le pus est signalée par la teinte bleuâtre que prennent les linges de pansement et par l'odeur caractéristique que répandent les plaies.

Dans le pus, on cherchera le bacille au moyen de l'examen microscopique de lamelles colorées au violet de gentiane ou à la thionine ; de plus, on fera des isolements sur plaques de gélatine avec un peu de pus ; les colonies du Bacille de Gessard se reconnaîtront facilement à leur aspect.

L'inoculation sera pratiquée dans le péritoine du cobaye.

Dans l'eau, Besson a isolé facilement le Bacille pyocyanique en ensemençant une certaine quantité du liquide dans le milieu gélo-pepto-sel de

Metchnikoff ; dès qu'un voile s'est formé (douzième-quinzième heure), on fait un second passage. Une trace du deuxième voile sert à ensemencer des plaques de gélatine où l'on isole facilement le microbe.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Bacille pyocyanique se présente sous la forme d'un petit bâtonnet mince, à extrémités arrondies, de dimensions assez variables et



Fig. 172. — Forme normale dans le bouillon de bœuf.

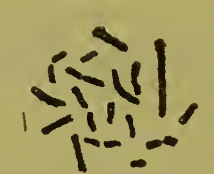


Fig. 173. — Culture dans du bouillon additionné de 0gr,02 p. 100 de naphtol, après quarante-huit heures.

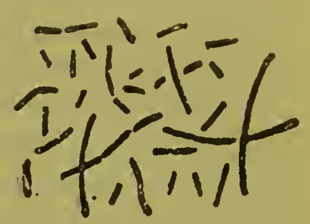


Fig. 174. — Culture dans du bouillon additionné de 4 p. 100 d'alcool, après vingt-quatre heures.

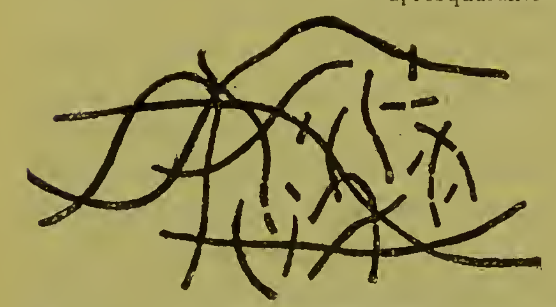


Fig. 175. — Culture dans du bouillon additionné de 0gr,015 p. 100 de bichromate de potasse, après quinze heures.

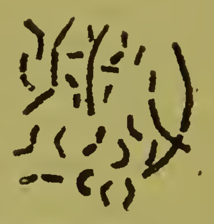


Fig. 176. — Culture dans du bouillon additionné de 0gr,06 p. 100 d'acide borique, après quarante-huit heures.

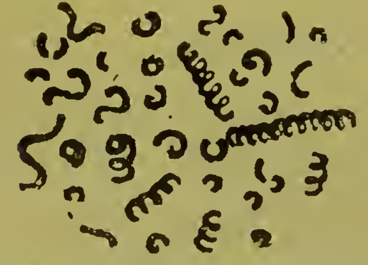


Fig. 177. — Culture dans du bouillon additionné de 0gr,70 p. 100 d'acide borique, après six jours.

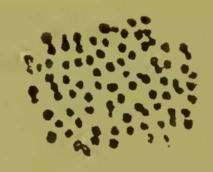


Fig. 178. — Culture âgée de quelques semaines dans du bouillon additionné de 0gr,10 p. 100 de créosote.

Fig. 172 à 178. — Formes diverses que prend le *Bacille du pus bleu* dans les cultures auxquelles on ajoute des antiseptiques. (D'après Guignard et Charrin.)

mobile ; sa longueur moyenne est de 1 μ,5 environ, sa largeur de 0,5 à 0,6 μ.

Coloration. — Le Bacille pyocyanique se colore aisément par les couleurs basiques d'aniline ; il prend le Gram.

Variations morphologiques. — L'aspect du Bacille pyocyanique est susceptible de se modifier considérablement quand on ensemence le microbe dans des milieux additionnés de faibles doses de substances antiseptiques (Guignard et Charrin) ; c'est ainsi que dans du bouillon contenant 0,02 p. 100 d'acide phénique, le bacille prend une forme longue, filamenteuse ; l'addition d'alcool, de bichromate de potasse agit de même ; dans le bouillon additionné d'acide borique, le bacille prend une forme spirillaire ; dans un milieu créosoté, il a l'aspect de coccus.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Bacille de Gessard est facultativement anaérobie, mais il ne fabrique de la matière colorante qu'au



Fig. 179. — Bacille pyocyanique. — Culture en bouillon, premier jour.



Fig. 180. — Bacille pyocyanique. — Culture en bouillon, troisième jour.



Fig. 181. — Bacille pyocyanique. — Culture en bouillon, septième jour.

contact de l'air. Il cultive entre + 15° et 43° ; la température optima est comprise entre 35° et 37°.

Bouillon. — A 37°, trouble dès la huitième heure, puis apparition d'une teinte verdâtre fluorescente. Les jours suivants il se forme un voile blanc ridé à la surface du bouillon ; ce voile épaissit, devient sec, brunâtre et tombe au fond du tube où il se forme un dépôt blanc sale ; le bouillon prend alors une teinte vert foncé, puis brunâtre. La culture est visqueuse, filante et répand une odeur caractéristique.

Gélatine. — *Piqûre.* — Dès le deuxième jour, à 20°, il se forme de petites colonies le long de la piqûre ; ces colonies confluent, donnent une strie blanche et, vers le troisième jour, apparaît une cupule de liquéfaction (*liquéfaction en verre à champagne*) ; la liquéfaction s'étend rapidement jusqu'aux parois du tube ; le milieu se colore en vert.

Colonies isolées. — Dès le deuxième jour apparaissent sur les plaques de petites colonies jaunâtres, granuleuses; ces colonies liquéfient rapidement autour d'elles, et la liquéfaction envahit la totalité de la plaque. La gélatine prend une teinte verte.

Gélose. — Dès le premier jour à 37°, apparition d'une strie verdâtre qui envahit rapidement la surface de la gélose ; la gélose prend une teinte verte fluorescente.

Pomme de terre. — Le long de la strie d'inoculation, se développe un enduit épais, coloré en brun ; si on racle cet enduit, la partie de la pomme de terre sous-jacente verdit au contact de l'air.

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — PIGMENTS (Gessard).

Quand on agite une culture en bouillon avec du chloroforme et qu'on abandonne un instant le tube au repos, il se forme à la partie inférieure une couche chloroformique teintée en bleu pur, tandis qu'il surnage un liquide aqueux d'un beau vert fluorescent.

Le Bacille pyocyanique sécrète en effet deux pigments, l'un bleu, la *pyocyanine* ; l'autre vert fluorescent. Au contact de l'air, la pyocyanine s'oxyde et donne une matière brune, la *pyoxanthose*.

On peut faire varier à volonté la production de la pyocyanine et de la matière verte en ensemençant le bacille sur différents milieux de culture.

Nous venons de dire qu'en bouillon le bacille sécrète de la pyocyanine et de la matière verte. Dans une solution de peptone, Gessard a vu le bacille se développer sans produire de matière verte, la culture avait une belle teinte bleue : ce phénomène ne se produit pas avec toutes les peptones ; de même, sur gélose pepto-glycérinée, la production de pyocyanine est consi-

dérablement accrue. La pyocyanine se produit seule dans une solution de gélatine à 10 p. 100 additionnée d'un peu de glycérine et maintenue à 35°.

Au contraire, dans un milieu contenant 2 p. 100 de glucose, la matière verte se produit seule; il en est de même sur l'albumine de l'œuf. L'addition au bouillon de 5 à 6 p. 100 de glucose fait cesser la production de matière colorante. La culture en sérum d'animaux immunisés a le même effet.

Gessard est arrivé à créer des bacilles donnant, les uns de la matière verte, les autres de la pyocyanine. Wasserzug, en cultivant le bacille sur des milieux légèrement acides, lui a fait perdre, d'une façon définitive, la propriété de fabriquer des pigments ; Charrin est arrivé au même résultat par des cultures en série dans du bouillon à 42°.

La pyocyanine s'obtient facilement en épuisant par le chloroforme une culture en bouillon ou sur gélose ; dans ce dernier cas, il suffit de laisser le chloroforme en contact avec la culture pendant quelques heures sans agitation. Le chloroforme prend une teinte bleue et par évaporation abandonne la pyocyanine sous forme de longues aiguilles bleues. Les solutions de pyocyanine sont virées au rouge par les acides faibles et se recolorent en bleu sous l'influence des alcalis. Les cultures en bouillon et en solution de peptone filtrées sur la bougie Chamberland gardent leur coloration. La pyocyanine n'est pas toxique.

§ 2. — TOXINES.

Les cultures filtrées du Bacille pyocyanique injectées au lapin en quantité suffisante amènent la mort de cet animal avec tous les symptômes de la maladie pyocyanique expérimentale aiguë, ou déterminent une cachexie s'accompagnant de paralysies et aboutissant parfois à la mort. En stérilisant par le toluol des cultures ayant séjourné quarante jours à l'étuve, Wassermann a obtenu une toxine tuant le cobaye à la dose de $0^{ccm},5$ injecté dans le péritoine.

La toxicité des cultures n'est pas due à la pyocyanine, mais à un certain nombre d'autres substances. De ces substances, les unes sont volatiles, facilement altérables et n'ont qu'une action passagère. Les autres, non volatiles, se divisent en deux groupes : celles du premier groupe, les plus actives, sont précipitables par l'alcool, celles du second groupe sont solubles dans l'alcool (Arnaud et Charrin).

3. — VACCINATION. — SÉROTHÉRAPIE.

Nous avons dit que des doses moyennes de cultures inoculées sous la peau du lapin ne lui confèrent pas la maladie pyocyanique.

En injectant ainsi à cinq ou six reprises et à trois ou quatre jours d'intervalle des doses de 0,5 à 1 centimètre cube de culture on rend les lapins réfractaires.

L'injection de petites doses de cultures filtrées ou chauffées à 115° permet également d'obtenir l'immunisation du lapin; ces cultures filtrées renferment, d'après Bouchard, Charrin et Arnaud, des substances immunisantes, différentes des substances toxiques. Le sang et l'urine des animaux qui ont reçu des cultures filtrées jouissent de propriétés immunisantes.

Le Bacille pyocyanique pousse dans le sérum des animaux immunisés, il y conserve sa forme, sa vitalité et sa virulence, mais il y donne des *colonies agglutinées* (Charrin et Roger, Ghéorghiewsky). Le Bacille pyocyanique n'élabore pas de pigment sur le sérum des animaux immunisés; bien plus, un peu de ce sérum ajouté à du sérum neuf empêche la pigmentation des cultures. Le sérum des animaux immunisés n'est donc pas bactéricide, il est simplement agglutinant *in vitro*; la propriété agglutinative ne marche pas parallèlement avec la propriété préventive. La destruction des bacilles chez les animaux immunisés s'accomplit à l'intérieur des phagocytes, il n'y a pas de destruction extracellulaire (Ghéorghiewsky).

§ 4. — ANTAGONISME.

Dans les cultures le Bacille pyocyanique empêche le développement du charbon ; de même, quand on injecte aux animaux réceptifs au charbon un mélange de Bactéridie et de Bacille de Gessard, ils ne prennent pas le charbon : bien plus, les cultures pyocyaniques débarrassées des microbes par la filtration sur porcelaine possèdent les mêmes propriétés empêchantes (Blagovetschensky).

Le Bacille pyocyanique possède des propriétés empêchantes analogues vis-à-vis du Vibrion du choléra (Kitasato).

Rumpf a signalé un pareil antagonisme entre le Bacille de Gessard et le Bacille d'Eberth : il aurait traité avec succès 65 cas de fièvre typhoïde par des injections de cultures stérilisées de Bacille pyocyanique. Il ne semble pas que ses affirmations méritent beaucoup de crédit; des recherches analogues que nous avons entreprises tendent à nous faire admettre au contraire que les injections préalables de cultures filtrées du Bacille pyocyanique rendent les cobayes plus sensibles à l'infection par le Bacille d'Eberth et le *Bacterium coli*. — De plus on a signalé l'infection par le Bacille pyocyanique coïncidant chez l'homme avec une fièvre typhoïde mortelle.

CHAPITRE XIII

LE BACILLE DU CHANCRE MOU

Le Bacille du chancre mou, découvert par Ducrey, a été étudié par Unna, Nicolle, etc.

Dans le pus chancreux le Bacille de Ducrey se trouve d'ordinaire associé à divers microbes : Staphylocoques, Tétragène, *Bacillus cutis commune* de Nicolle, Gonocoque. Le bacille se rencontre entre les fibres conjonctives du derme, il ne pénètre ni dans les cellules fixes des tissus, ni dans les vaisseaux; lors de la réparation des lésions on trouve de nombreux bacilles englobés dans les leucocytes, la virulence du pus diminue à mesure que la cicatrisation progresse.

Le bacille se rencontre à l'état pur dans le *bubon chancrelleux*; dans le pus de ce bubon l'examen microscopique échoue d'ordinaire (92 fois sur 100, Rille) à déceler le bacille (*pus stérile* de Straus), mais Bezançon, Griffon et Le Sourd y ont démontré sa présence par les cultures.

Article I. — CHANCRE EXPÉRIMENTAL.

Homme. — Le pus chancreux et les cultures du bacille, inoculés à l'homme, reproduisent un chancre mou typique. Une première atteinte ne confère pas l'immunité, le chancre est indéfiniment réinoculable en série chez le même individu.

L'inoculation ne doit pas être pratiquée sur les cuisses ni sur la zone sous-ombilicale de l'abdomen ; on choisira de préférence la région externe du bras. On peut inoculer à la lancette en ayant soin de pénétrer très peu (1 à 2 millimètres au plus) de façon à respecter le derme ; il vaut mieux utiliser une épingle flambée, chargée de virus et avec laquelle on éraille légèrement l'épiderme sur une longueur de 2 à 3 millimètres ; une rosée sanguine doit apparaître au niveau de la déchirure du tégument. On doit protéger l'endroit inoculé contre les frottements et les souillures : le procédé le plus commode, qui permet l'observation de la lésion, consiste à recouvrir la petite plaie avec un verre de montre flambé ; le verre est maintenu adhérent au moyen d'une compresse de gaze perforée à son centre de façon à recouvrir le verre seulement sur sa périphérie, et fixée au verre d'une part, à la peau de l'autre, avec du collodion. Le tout est protégé par un peu d'ouate et une bande. La lésion commence à évoluer dès le fin du premier jour et a pris l'aspect caractéristique du quatrième au sixième jour.

Animaux. — L'inoculation échoue chez les animaux de laboratoire. Chez le singe on peut obtenir un chancre expérimental (Auzias-Turenne; Quinquaud et Nicolle).

Article II. — RECHERCHE ET DIAGNOSTIC.

Le Bacille de Ducrey sera recherché par l'examen microscopique, les cultures et l'inoculation.

a. **Examen microscopique.** — *Pus.* — Racler la surface de l'ulcération, étaler le pus sur des lamelles en ayant soin de ne pas écraser la préparation pour éviter de dissocier les chaînettes ; sécher, fixer, et colorer comme il sera dit plus loin.

Coupes. — Les fragments de peau seront fixés au sublimé acide, durcis à l'alcool et montés dans la paraffine. Colorer comme il est indiqué plus loin.

b. **Cultures.** — Ensemencer le pus du chancre ou du bubon sur des tubes de gélose-sang. Il est nécessaire d'ensemencer beaucoup de pus; pour obtenir le matériel d'ensemencement, on laisse le pus s'accumuler sous pansement sec à la surface du chancre préalablement désinfecté.

c. **Inoculation.** — Sera pratiquée sur l'homme porteur du chancre soumis à l'étude; elle permet de faire rapidement le diagnostic de la nature du chancre : il ne faut pas oublier qu'un chancre peut être à la fois syphilitique et ducreysien (*chancre mixte*); dans ce cas il est réinoculable ; le succès de l'inoculation permet d'affirmer la nature ducreysienne du chancre, mais non d'écarter absolument la possibilité d'une infection syphilitique associée.

Article III. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

C'est un gros bacille, peu allongé, mesurant 0,50 μ de largeur sur 1,50 à 2 μ de longueur ; ses extrémités sont arrondies; il présente parfois deux encoches latérales qui lui donnent l'aspect d'un 8. Il se rencontre dans le pus, isolé, ou en chaînettes de trois à cinq et même dix à vingt éléments; les amas peuvent être constitués par des chaînettes serrées les unes contre les autres. Les bacilles sont d'ordinaire libres, mais il n'est pas rare de les rencontrer à l'intérieur des leucocytes polynucléaires.

Dans les cultures sur gélose-sang, les bacilles sont isolés ou groupés en amas ou en courtes chaînettes; dans le sérum liquide, les ba-

cilles sont groupés en chaînettes très flexueuses et enchevêtrées (streptobacilles). Dans le liquide condensé au fond des tubes de gélose-sang, les bacilles sont plus grêles et les chaînettes beaucoup plus longues.

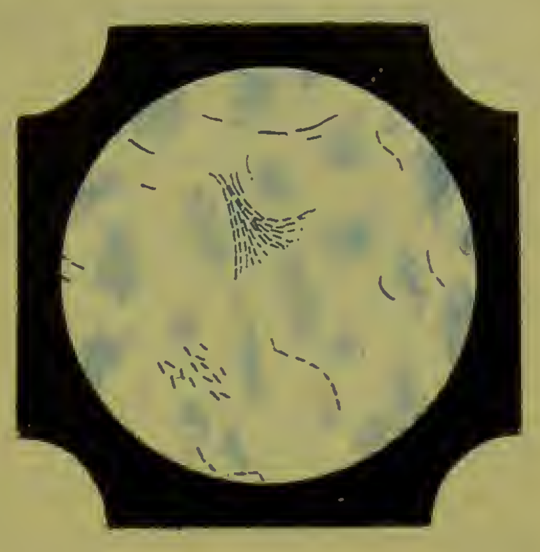


Fig. 182. — Bacille du chancre mou. — Coloration par la méthode de Nicolle.

Coloration. — Le Bacille de Ducrey se colore aisément par les couleurs basiques d'aniline, mais le plus souvent la partie centrale reste incolore, les extrémités fixant seules la matière colorante (bacille en navette). Le bacille ne prend pas le Gram.

a. *Pus et cultures.* — Colorer par la thionine, le violet ou le bleu phéniqués. Examiner dans l'eau ou dans le baume.

b. *Coupes.* — Le procédé de choix est le procédé au tanin de Nicolle (Voy. p. 226). Colorer au bleu phéniqué de Kühne, faire agir quelques secondes la solution de tanin au dixième, laver à l'eau, à l'alcool, à l'essence de girofles et au xylol. Monter dans le baume.



Fig. 183. — Bacille du chancre mou. — Aspect du bacille cultivé sur gélose-sang (d'après Bezançon, Griffon et Le Sourd).



Fig. 184. — Bacille du chancre mou. — Aspect du bacille cultivé en sérum liquide (d'après Bezançon, Griffon et Le Sourd).

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Bacille du chancre mou ne cultive pas sur les milieux ordinaires.

Petersen paraît avoir obtenu d'une manière inconstante le développement du bacille sur l'agar-sérum, mais ses recherches n'ont pas été confirmées par les expériences de contrôle de Ch. Nicolle. Istamanoff et Akspiantz. Lenglet utilisèrent des macérations de peau humaine additionnées de gélose, mais la technique qu'ils ont suivie reste obscure et leurs résultats peu convaincants. C'est un mémoire récent de Bezançon, Griffon et Le Sourd qui a fait entrer la culture du Bacille de Ducrey dans la pratique bactériologique : c'est à ce mémoire que nous empruntons la substance de ce paragraphe.

Le milieu le plus favorable est la gélose-sang (sang de lapin) de Bezançon et Griffon (Voy. p. 55), puis vient le sérum non coagulé de lapin. Les tentatives de culture échouent sur tous les milieux usuels, même après acclimatement du bacille par le passage sur une série de tubes de sang gélosé.

Le Bacille de Ducrey est aérobie ; il cultive à 37°.

Gélose-sang. — Après ensemencement large de pus chancreux sur tubes inclinés, on obtient en vingt-quatre heures à 37° « des colonies arrondies, saillantes, brillantes, qui atteignent leur complet développement en quarante-huit heures et sont alors opaques, grisâtres, présentant de 1 à 2 millimètres de diamètre. Lorsqu'on les prélève pour l'examen microscopique, elles ont tendance à fuir en masse devant le fil de platine, glissant à la surface du milieu, et, sur la lamelle, sont difficiles à dissocier ».

Parfois les colonies n'apparaissent qu'au bout de quarante-huit heures et restent rares. Les repiquages donnent des cultures plus abondantes, les colonies sont très nombreuses, certaines peuvent atteindre le volume d'une tête d'épingle, mais jamais elles ne confluent en traînée.

Sérum de lapin. — Dans ce milieu non coagulé la culture est moins riche, il se produit un trouble léger avec quelques petits flocons ; la vitalité du microbe y est de courte durée.

Article IV. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité et virulence. — Le pus chancreux conservé à l'abri de l'air conserve longtemps sa virulence : Ricord a obtenu des inoculations positives avec un pus de dix-sept jours. Il se conserve également bien dans l'urine, l'eau, le mucus vaginal, etc. La dessiccation

à la température ordinaire semble détruire la virulence du pus chancreux en vingt-quatre à trente-six heures; cependant Spérino a obtenu une inoculation positive avec du pus desséché sur une lancette depuis sept mois. Le chauffage pendant dix-huit heures à 37°, ou pendant une heure à 42°, annihile la virulence (Aubert). Une température de — 16° reste sans action sur la virulence (Jullien). Le bacille est rapidement détruit par les antiseptiques faibles, les bases et les acides.

Dans les cultures sur gélose-sang, le bacille conserve fort longtemps sa vitalité et sa virulence : le repiquage de cultures ayant séjourné plus de trois semaines à 37° donne un résultat positif. Après onze générations sur gélose-sang, le bacille est encore capable de produire un chancre expérimental chez l'homme. Dans les cultures en sérum non coagulé, la vitalité du microbe est de courte durée (Bezançon, Griffon et Le Sourd).

CHAPITRE XIV

I. — LE BACILLE DE LA POURRITURE D'HÔPITAL

Le Bacille de la pourriture d'hôpital a été découvert par Vincent. La présence du Bacille de Vincent est constante dans les lésions de la pourriture d'hôpital; il se rencontre en abondance dans la pulpe pseudo-membraneuse qui existe à la surface des plaies. Il n'envahit pas l'organisme, on ne le trouve jamais dans le sang ni dans les ganglions.

Dans ces lésions le Bacille de Vincent se rencontre à l'état pur ou associé à d'autres microbes; quelquefois on trouve quelques microcoques ou bacilles plus nombreux à la surface des lésions, mais l'association la plus fréquente (40 fois sur 47 cas examinés) est un *spirille* très fin, difficile à colorer et non cultivable. Les autres microbes associés appartiennent aux espèces suivantes : Staphylocoque pyogène, Streptocoque, *Proteus vulgaris*, *Bacillus pyocyaneus*, *Bacterium coli*, Bacille de Friedländer.

Article I. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

Homme. — L'inoculation directe de l'homme à l'homme, tentée depuis longtemps par Willaume, Percy, Richerand, Dupuytren, etc., et récemment par Vincent sur lui-même et sur des Arabes, a toujours échoué à reproduire les lésions de la pourriture d'hôpital.

Animaux. — 1° Chez le *cobaye*, le *lapin*, le *rat blanc*, des plaies artificielles couvertes de pulpe fraîche ont guéri rapidement sans présenter les caractères de la pourriture d'hôpital. L'injection d'émulsions de fausses membranes, sous la peau, dans le péritoine, dans le sang, dans les muscles n'entraine aucun accident sérieux; il se produit simplement des abcès dus aux microbes associés. Même après la section du sciatique, la ligature de la fémorale, le broiement d'un membre, les inoculations ont échoué.

Cependant Coyon ayant pratiqué dans la cuisse d'un cobaye une plaie profonde, anfractueuse, avec dilacération musculaire, y ayant introduit des membranes de pourriture d'hôpital, puis suturé et collodionné la peau, obtint au bout de dix-huit jours une plaie en

entonnoir recouverte d'une couenne où fourmillait le Bacille de Vincent.

A l'*état de jeûne*, les animaux sains ne se montrent pas réceptifs.

2° Mais en se servant d'animaux dont l'organisme a été affaibli par une maladie microbienne ou en renforçant l'activité du bacille par une association, Vincent est arrivé à reproduire la pourriture d'hôpital.

Un *lapin tuberculeux* reçut sous la peau du flanc 1 centimètre cube d'émulsion de pulpe gangreneuse et présenta un petit abcès, puis une plaie ulcéreuse couverte d'une membrane contenant le bacille.

L'*association* au virus de quelques gouttes de culture de Streptocoque, de Staphylocoque pyogène, de *Bacterium coli*, de Bacille de Friedländer ou de Bacille pyocyanique a permis de conférer la pourriture d'hôpital aux lapins : toujours, dans les lésions, les germes favorisants tendent à disparaître et le bacille spécifique se retrouve à peu près à l'état pur ; le plus souvent, les microbes favorisants se trouvent à la surface des lésions et les Bacilles de Vincent prédominent à la profondeur de l'exsudat membraneux. Les inoculations en série ne réussissent pas.

Article II. — **RECHERCHE ET CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.**

Dans les frottis préparés avec la pulpe pseudo-membraneuse et colorés avec la fuchsine de Ziehl, la thionine ou le violet phéniqués, on voit de nombreux bacilles mesurant 4 à 8 μ de long sur 1 μ environ d'épaisseur, souvent rectilignes, quelquefois légèrement incurvés et même en forme d'S allongé; l'aspect de ces bacilles se rapproche de celui du vibrion septique avec cette différence que leurs extrémités ne sont pas nettement carrées, mais amincies ou arrondies. Beaucoup de bacilles sont articulés par deux. Le nombre des bacilles

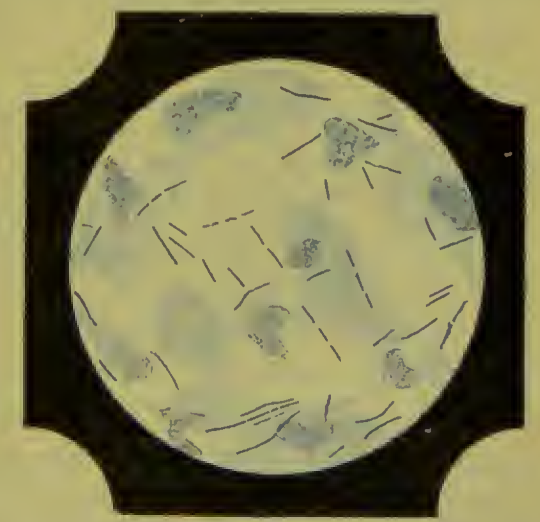


Fig. 185. — Bacille de la pourriture d'hôpital (d'après Vincent).

dans les préparations est en rapport avec la gravité des cas : dans les cas bénins, on en trouve vingt à trente par préparation ; dans les

cas graves, un nombre considérable, une véritable culture pure.

Dans des parcelles de pulpe fraîche examinées dans une goutte de bouillon ou d'eau stérile, le bacille paraît immobile.

Coloration. — Le Bacille de Vincent se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline ; il ne prend pas le Gram.

Les bacilles colorés par le bleu de méthylène fixent irrégulièrement la matière colorante et présentent des vacuoles inégales non arrondies qui ne sont évidemment pas des spores et ne se colorent pas par les procédés de coloration des spores.

Dans les plaies traitées par les antiseptiques, on note de nombreuses formes d'involution : bacilles vacuolaires à bouts terminés en fuseau ou à bords échancrés, formes longues à étranglements bien colorés et à renflements incolores.

Coupes. — Les fragments de tissus sont fixés dans la solution aqueuse saturée de sublimé, puis durcis dans de l'alcool progressivement renforcé. Les coupes sont colorées de préférence à la thionine ; Vincent recommande le procédé suivant :

1° Colorer pendant dix minutes dans la thionine phéniquée.

2° Faire agir pendant quelques secondes la solution suivante :

Alcool absolu................	200 centimètres cubes.
Iode..........................	0gr,01

3° Remplacer la solution iodée par de l'alcool absolu ordinaire ou teinté par la safranine ou la fluorescéine.

4° Éclaircir par l'huile d'aniline, laver au toluène.

5° Monter dans le baume.

Sur les coupes ainsi préparées, on constate deux couches :

1° Une couche superficielle, épaisse de 1 à 3 millimètres, teintée en gris bleuâtre, constituée par l'exsudat diphtéroïde, remarquablement pauvre en éléments cellulaires dans sa partie superficielle, mais constituée à sa partie profonde par une sorte de buisson compact de bacilles.

2° Une couche constituée par les tissus mortifiés, infiltrés de sang et dans lesquels toute trace de structure a disparu sur une certaine épaisseur : l'on remarque une agglomération de leucocytes au-dessous de la couche microbienne.

Essais de culture. — Le Bacille de la pourriture d'hôpital n'a pu être cultivé par Vincent; Coyon, après Vincent, a également échoué dans ses essais de culture.

Vincent a essayé les milieux les plus divers : milieux usuels, bouillon additionné de sérum, sang, sérum humain, infusion de foin, pulpe gangreneuse, milieux sur lesquels avaient poussé le Streptocoque et le Staphylocoque. Les essais de culture ont eu lieu à l'air et à l'abri de l'air.

II. — LE BACILLE FUSIFORME DE VINCENT

Vincent a rencontré dans des angines et des stomatites ulcéro-membraneuses pouvant simuler des lésions diphtéroïdes un bacille fort analogue sinon identique à celui de la pourriture d'hôpital. Les recherches de Vincent ont été confirmées par de nombreux auteurs (Bernheim, Raoult et Thiry, Abel, Panoff, Letulle, etc.).

RECHERCHE ET CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

Dans les frottis de fausses membranes colorés par la fuchsine ou les violets phéniqués, on voit des bacilles mesurant environ 5 à 10 μ de long sur 0,6 μ de large, renflés à leur partie moyenne et s'effilant aux extrémités à la façon d'un fuseau ; souvent rectilignes, ils sont parfois légèrement recourbés et affectent même la forme d'un S allongé ; certains bacilles sont réunis par deux. Ils sont immobiles.

Le Bacille fusiforme est souvent associé à des *spirilles* identiques à ceux qui ont été décrits dans la pourriture d'hôpital.

Coloration. — Le Bacille fusiforme se colore de la même façon que celui de la pourriture d'hôpital. Il ne prend pas le Gram. Les bacilles colorés présentent souvent des vacuoles incolores qui ne sont pas des spores.

Dans les coupes de membranes colorées comme nous l'avons dit à propos de la pourriture d'hôpital, les bacilles forment des amas feutrés dans les parties profondes de la couche superficielle.

Cultures. — La culture du Bacille fusiforme à l'état pur n'a pas encore été obtenue. Une parcelle de l'exsudat amygdalien ensemencée dans du bouillon peptonisé donne une culture impure dans laquelle le Bacille s'est un peu multiplié ; dans le bouillon de Martin, le bacille donne des filaments allongés et immobiles ; les milieux les plus favorables semblent le sérum, le liquide céphalo-rachidien additionné de sang, les sérosités de pleurésie, d'ascite, prélevés chez l'homme. Les cultures dégagent une odeur fétide ; le bacille y est tué en quelques minutes par une température de 60° (Vincent).

Inoculations. — L'inoculation des cultures sous la peau ou dans les muscles des animaux de laboratoire produit des abcès, des foyers de nécrose ulcéreuse, où l'on trouve le Bacille fusiforme à côté de nombreuses bactéries étrangères.

CHAPITRE XV

LE PNEUMOCOQUE

Le Pneumocoque (1) est l'agent de la pneumonie lobaire (Talamon, Fränkel), mais là ne se borne pas son rôle étiologique : il cause la plus grande partie des complications de la pneumonie et un certain nombre d'autres affections.

I. — Le Pneumocoque se rencontre fréquemment dans la *salive* des personnes saines (Pasteur, Sternberg, Fränkel); Netter l'a rencontré quatre fois sur cinq dans la salive des sujets ayant déjà eu une pneumonie et une fois sur cinq dans celle des personnes qui n'ont jamais été atteintes par cette affection. Chez les premiers, Netter a constaté que, pendant la pneumonie, le Pneumocoque de la salive est virulent; cette virulence disparaît au moment de la crise pour se manifester de nouveau au bout d'une quinzaine de jours. Chez les sujets sains le Pneumocoque vit en parasite inoffensif dans la cavité buccale; mais, si la résistance de l'organisme vient à être affaiblie pour un motif quelconque, la bactérie triomphe de l'action protectrice des phagocytes et envahit le poumon.

II. — Dans la *pneumonie lobaire* on trouve toujours le Pneumocoque dans le foyer d'hépatisation ; le microbe peut se rencontrer à l'état de pureté ou associé à d'autres bactéries, principalement le Streptocoque pyogène, les Staphylocoques et le Bacille de Friedländer. On le retrouve dans les crachats rouillés. Certaines *broncho-pneumonies* relèvent du Pneumocoque.

III. — Le Pneumocoque envahit quelquefois le *sang* et va causer au voisinage ou au loin des complications souvent suppuratives (Friedländer, Talamon, Fränkel). Le *pus* à pneumocoques est épais, visqueux, très riche en éléments cellulaires et présente une coloration verdâtre ; ces suppurations ont une tendance naturelle à la guérison.

IV. — Les *pleurésies* et *péricardites* fibrineuses ou purulentes, les *endocardites* végétante ou ulcéreuse, la *méningite*, la *néphrite*, la *parotidite* suppurée, les *arthrites* suppurées, la *péritonite*, la *métrite*, des *abcès* à Pneumocoque peuvent apparaître comme complications de la pneumonie; mais il faut savoir que les complications de cette maladie peuvent également être causées par les différents microbes de la suppuration.

V. — En dehors de ces cas où coexiste une pneumonie, le microbe de Talamon-Fränkel peut déterminer, primitivement, des *pleurésies* fibrino-purulentes, des *péricardites* séro-fibrineuses ou suppurées (Osler, Banti),

(1) Synonymie : *Streptococcus lanceolatus*, *Micrococcus Pasteuri*.

des *otites suppurées* (Zanfal, Netter), des *endocardites ulcéreuses* (Jaccoud et Netter, Weichselbaum), des *angines* simples ou membraneuses (Cornil, Jaccoud, Ménétrier, Rendu et Boulloche), des *péritonites*, des *suppurations des voies biliaires*.

VI. — Le Pneumocoque cause un grand nombre de *méningites* primitives ; Netter a trouvé ce microbe dix-huit fois sur trente et un cas de méningite non accompagnée ou suivie de pneumonie.

Marchoux a décrit une épidémie de méningite à forme cérébro-spinale qui a sévi sur les nègres du Sénégal, coïncidant avec de nombreux cas de pneumonie et qui était causée par le Pneumocoque ; il a montré que les nègres étaient beaucoup plus sensibles à ce microbe que les individus de race blanche. Cette méningite a guéri parfois sans laisser de traces ; d'autres fois, au contraire, le retour à la santé a été incomplet et il a persisté une méningo-encéphalite diffuse se traduisant par les symptômes cliniques de la *maladie du sommeil*.

On a attribué au Pneumocoque la *méningite cérébro-spinale épidémique* (Foa, Landouzy) ; il semble démontré aujourd'hui que l'agent de cette maladie est un microbe voisin du Pneumocoque et décrit par Weichselbaum sous le nom de Diplocoque intracellulaire (Voy. p. 359).

Article I. — **PNEUMOCOCCIE EXPÉRIMENTALE.**

§ 1er. — RÉCEPTIVITÉ. — SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

La souris est l'animal le plus sensible au Pneumocoque : viennent ensuite le lapin, puis, par ordre de sensibilité décroissante, le rat, le mouton, le cobaye et le chien. Le pigeon est réfractaire.

Souris. — L'inoculation sous la peau de petites quantités de cultures ou d'exsudats pneumococciques cause invariablement la mort de la souris en douze à trente heures. L'animal succombe à une septicémie à Pneumocoque sans présenter d'altérations pulmonaires ; au point d'inoculation on ne constate qu'un peu d'œdème. A l'autopsie, les lésions sont minimes : on ne trouve guère que de l'hypertrophie de la rate ; le sang est noir, et contient, ainsi que la rate, les autres viscères, le péritoine et la moelle osseuse, une grande quantité de Pneumocoques encapsulés.

Lapin. — Deux cas peuvent se présenter :

a. *Inoculation d'un Pneumocoque actif.* — L'inoculation sous-cutanée, péritonéale ou intraveineuse, produit une septicémie qui entraîne la mort en vingt-quatre à soixante-douze heures ; on constate peu de réaction locale, de l'hypertrophie de la rate, et la présence du Pneumocoque dans le sang et les viscères.

Quand l'inoculation a été pratiquée dans le poumon, on peut observer en même temps une pneumonie lobaire et souvent une pleurésie du même côté.

b. *Inoculation d'un Pneumocoque atténué.* — L'inoculation sous-

cutanée entraîne la mort beaucoup moins rapidement que dans le cas précédent ; on constate une réaction inflammatoire au lieu de l'inoculation ; l'animal succombe non plus à une septicémie sans localisations viscérales, mais à une véritable pneumonie lobaire identique à celle de l'homme, et s'accompagnant fréquemment de pleurésie, de péricardite, de péritonite, etc.

Rat. — Le rat ne succombe qu'à l'inoculation de doses de virus beaucoup plus fortes que celles qui sont nécessaires pour tuer la souris et le lapin. Au point d'inoculation il se produit une réaction inflammatoire intense : l'œdème séro-fibrineux peut s'étendre à toute la paroi de l'abdomen et du thorax : il se produit fréquemment une pneumonie lobaire et, à l'autopsie, on trouve peu de Pneumocoques dans le sang. L'inoculation dans le poumon produit un noyau de pneumonie lobaire accompagné de pleurésie séro-fibrineuse.

Mouton. — Le mouton ne succombe guère qu'à l'inoculation sous-cutanée de doses de cultures supérieures à un centimètre cube. L'inoculation entraîne une infiltration œdémateuse très étendue autour du point d'entrée de l'aiguille ; quand la mort survient, on trouve peu de microbes dans le sang.

L'inoculation intrapulmonaire provoque une pneumonie mortelle.

L'inoculation intratrachéale semble inoffensive, cependant Gamaleia a réussi à provoquer par ce moyen une pneumonie mortelle, à la condition d'irriter au préalable les voies respiratoires en y injectant une solution de tartre stibié.

La vitalité et la virulence du Pneumocoque s'atténuent rapidement par le passage chez le mouton et les inoculations en série sont impossibles.

Cobaye. — Le cobaye est très résistant ; après inoculation, il présente une réaction locale plus ou moins marquée et guérit le plus souvent.

Chien. — Le chien ne succombe qu'à des doses massives ; après l'inoculation sous-cutanée, il se produit un œdème très étendu et la mort survient rarement vers le quatrième ou cinquième jour ; le sang renferme de rares Pneumocoques.

L'inoculation intrapulmonaire produit une pneumonie qui évolue comme celle de l'homme et se termine, en règle, par la guérison.

L'inoculation intratrachéale est d'ordinaire inoffensive ; cependant Tchistovich a réussi, par ce procédé, à tuer trois chiens sur dix-neuf inoculés. En pratiquant cette inoculation on observera scrupuleusement les règles indiquées page 186, pour ne pas déposer de virus dans les tissus avoisinant la trachée, ce qui fausserait les résultats.

En résumé, les animaux très réceptifs succombent à la septicémie pneumococcique ; la pneumonie se manifeste de préférence chez les animaux moins réceptifs. Ici, comme toujours, la gravité de l'infection est en raison inverse de l'importance de la lésion locale.

§ 2. — RECHERCHE ET DIAGNOSTIC DU PNEUMOCOQUE.

Homme. — A. Pendant la vie. — Le Pneumocoque sera recherché :

a. **Dans les crachats.** — Recueillir les crachats avec les précautions ordinaires (p. 191) ; avec une forte öse prélever une parcelle au centre d'un crachat rouillé.

1° En faire des *frottis*, pour l'examen microscopique (Voy. plus loin les procédés de coloration).

2° Il est inutile de pratiquer directement des *ensemencements* : les impuretés gêneraient le développement du Pneumocoque.

3° *Inoculer*, avec un peu de crachats broyés dans de l'eau stérile, une souris à la base de la queue ; si l'on se trouve bien en présence du Pneumocoque, l'animal succombe rapidement ; à l'autopsie, prélever purement du sang du cœur ou de la moelle osseuse et ensemencer avec ces substances des tubes de gélose et de bouillon qui seront placés à l'étuve à 37°.

Pour établir le diagnostic, l'inoculation doit toujours être faite à la souris et non au lapin ; celui-ci est moins sensible que la souris et certains crachats contiennent un Pneumocoque à peu près inoffensif pour le lapin et très virulent pour la souris (Gamaleia).

b. **Dans le suc pneumonique.** — On se procure le suc pneumonique en pratiquant une ponction dans le foyer hépatisé (Voy. p. 199) ; on recherche les Pneumocoques dans ce suc par l'examen microscopique et les inoculations. Bezançon et Griffon préfèrent ensemencer directement l'exsudat dans du sérum de lapin jeune et inoculer à la souris la culture obtenue au bout de vingt-quatre heures.

c. **Dans le pus, les exsudats.** — Même technique que pour le suc du poumon.

d. **Dans le sang.** — Le Pneumocoque ne se rencontre pas d'une manière constante dans le sang des pneumoniques (Foa, Talamon, Klemperer).

On le recherchera de préférence vers le cinquième ou sixième jour, surtout dans les cas graves. Quand l'affection doit entraîner la mort, on trouve ordinairement le Pneumocoque dans le sang pendant les derniers jours ou les dernières heures ; mais la constatation de la présence du Pneumocoque dans la circulation générale n'implique pas forcément un pronostic fatal.

On recherche le Pneumocoque dans le sang par l'*examen microscopique*, les *cultures* et l'*inoculation* à la souris. On prélève le sang nécessaire à ces recherches soit par piqûre du doigt, soit dans une veine du pli du coude (Voy. *Technique générale*).

B. A L'AUTOPSIE. — (Pour fournir des résultats satisfaisants, l'autopsie doit être pratiquée le plus tôt possible après la mort.) On recherchera le Pneumocoque :

a. **Dans le suc pulmonaire.** — Cautériser la surface du bloc hépatisé; y pénétrer avec une pipette Pasteur et aspirer du suc qui servira à préparer des lamelles, à pratiquer des ensemencements, des inoculations.

b. **Dans les coupes du poumon.** — De petits fragments du poumon hépatisé sont immédiatement fixés à l'alcool ou au sublimé acide ; ils seront ensuite inclus dans la paraffine, coupés et colorés par les méthodes indiquées plus loin.

c. **Dans le pus et les exsudats.** — Recueillir selon les règles ordinaires; préparer des frottis, ensemencer et inoculer.

Animaux. — Le Pneumocoque sera recherché dans le sang, la moelle osseuse, les sérosités pleurale, péritonéale, péricardique, les pulpes de viscères, les coupes d'organes, etc.

Des lamelles de sang, des frottis seront soumis à l'examen microscopique. Les ensemencements en sérum de lapin pratiqués avec le sang, la moelle osseuse, les exsudats, donnent des cultures pures qui seront utilisées pour de nouvelles inoculations.

Les organes à couper seront fixés à l'alcool ou au sublimé acide et inclus dans la paraffine.

ARTICLE II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

L'aspect du Pneumocoque diffère selon que le microbe provient de l'organisme de l'homme ou des animaux ou des cultures en milieux artificiels. Dans les cultures en milieux liquides albumineux (sérum, bouillon additionné de sang frais, etc.), le Pneumocoque a les mêmes caractères que dans l'organisme.

A. **Aspect dans l'organisme.** — Le Pneumocoque, dans les crachats, le sang, les pulpes d'organes, etc., se présente sous la forme de coccus, quelquefois arrondis, ordinairement ovalaires et légèrement effilés à leurs extrémités (formes en grain d'orge, lancette, flamme de bougie). Ces grains sont d'ordinaire réunis par deux, en diplocoques; les deux éléments d'un diplocoque se

regardent par une de leurs extrémités pointues ; on trouve çà et là quelques grains isolés et aussi de courtes chaînettes formées par trois ou quatre coccus. Les coccus isolés, les diplocoques et les chaînettes sont entourés d'une *capsule* ou auréole, sorte de gangue albumineuse qu'il est possible de colorer.



Fig. 186. — Pneumocoque (exsudat péritonéal du lapin). — Thionine phéniquée (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. III).

La taille du Pneumocoque est assez variable ; les plus petits éléments mesurent 0,50 sur 0 μ, 75 ; les plus grands 1 μ sur 1 μ, 25.

Coloration. — Le Pneumocoque se colore facilement par les couleurs d'aniline et prend le Gram ; on le recherchera de préférence par les procédés suivants :

a. Procédé recommandé (Nicolle). — Colorer le frottis, préparé selon les règles ordinaires, en le laissant au contact pendant quelques secondes avec le kristall violet phéniqué ; passer rapidement à l'alcool acétone au tiers ; laver, sécher, monter.



b. Méthode de Gram. — Doit toujours être employée pour le diagnostic. Elle permet d'obtenir de très belles préparations avec les lamelles de sang. Opérer suivant le procédé recommandé page 216 pour la double coloration. Les capsules restent incolores.

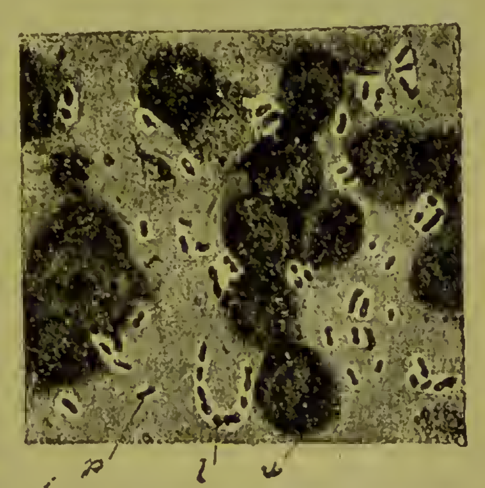


Fig. 187. — Pneumocoques dans la salive (d'après Biondi).

c. Coloration des capsules. — Un certain nombre de procédés permettent de colorer les capsules ; les capsules restent toujours plus claires que les grains qui y sont contenus. Le procédé indiqué page 149 teinte légèrement les capsules, on obtiendrait une coloration plus nette par la méthode suivante :

Colorer le frottis pendant une ou deux minutes avec le liquide de Ziehl ; laver, traiter rapidement par de l'eau additionnée de 1 p. 100 d'acide acétique ; laver, sécher, monter dans le baume.

d. COLORATION DES COUPES. — I. — Les coupes seront soumises de préférence à la double ou à la triple coloration selon la méthode de Gram (procédés recommandés p. 228). On pourrait encore utiliser le procédé de Weigert (p. 224).

II. — La coloration des capsules dans les coupes présente quelque difficulté, on l'obtiendra par un des procédés suivants :

Procédé de Friedländer. — 1° Plonger la coupe pendant vingt-quatre heures dans la solution suivante :

Fuchsine	1 gramme.
Alcool absolu	5 grammes.
Acide acétique cristallisé	2 —
Eau distillée	100 —

2° Au sortir du bain colorant la coupe est lavée à l'alcool, puis portée pendant deux minutes dans une solution d'acide acétique à 2 p. 100 ;

3° Laver à l'eau distillée ; déshydrater par l'alcool absolu ; éclaircir par l'essence de girofles et le xylol ; monter dans le baume.

Procédé de Ribbert. — 1° Colorer la coupe pendant quelques minutes dans la solution suivante :

Eau distillée	100 grammes.
Alcool à 95°	50 —
Acide acétique cristallisable	12gr,50
Violet dahlia	Q. S. pour saturer à chaud.

2° Au sortir du bain colorant laver la coupe à l'eau ; déshydrater par l'alcool absolu, éclaircir par l'essence de girofles et le xylol ; monter dans le baume.

B. **Aspect dans les cultures.** — Dans les cultures en milieux artificiels le Pneumocoque *n'est pas encapsulé* ; on ne retrouve des capsules que dans les cultures en sérum liquide ou en bouillon-sang.

Dans les cultures le Pneumocoque donne tantôt des grains lancéolés, tantôt des grains arrondis qui se rencontrent parfois à l'exclusion des formes lancéolées. Les grains sont isolés, associés en diplocoques ou en chaînettes courtes de trois à huit éléments : les chaînettes sont composées de diplocoques, le grand axe des grains se trouve dans le sens des chaînettes ; celles-ci sont surtout nombreuses et longues dans les cultures en bouillon.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Pneumocoque est un aérobie facultatif. Il ne se développe pas au-dessous de + 24°, aussi ne peut-on le cultiver sur la gélatine ordinaire. La température optima de

culture est aux environs de 35°-37°. Le développement s'arrête à 42°; il est plus actif dans les milieux liquides que sur les milieux solides et exige une légère alcalinité du milieu.

Gélose. — Après vingt-quatre heures à 37°, il se développe sur la gélose un fin semis de petites colonies transparentes, difficiles à voir, jamais confluentes, ressemblant à des gouttes de rosée.



Fig. 188. — Pneumocoque. — Strie sur gélose au troisième jour.

Sérum coagulé. — Mêmes colonies que sur la gélose; parfois les colonies se réunissent et forment un mince voile semi-transparent.

Bouillon. — A 37°, très léger trouble au bout de vingt-quatre à trente-six heures, puis précipitation d'un dépôt minime, pulvérulent.

Bouillon additionné de sang de lapin. — Pour préparer le milieu, recueillir aseptiquement du sang dans la veine auriculaire du lapin (p. 194) et ajouter ce sang à du bouillon stérilisé (une partie de sang pour trois à quatre parties de bouillon). Dans ce milieu, à 37°, le Pneumocoque cultive abondamment; il se produit un trouble notable, puis il se forme un précipité muqueux très riche en microbes.

Sérum liquide. — Le sérum qui convient le mieux est celui que l'on prépare avec du sang de lapin jeune, recueilli aseptiquement et non chauffé. Dans ce sérum à 37°, on obtient une culture très abondante; il se produit d'abord une augmentation de consistance du milieu en même temps qu'un trouble notable, puis un précipité abondant constitué par des Pneumocoques capsulés.

Lait. — Le Pneumocoque cultive dans le lait en le coagulant.

Pomme de terre. — Le Pneumocoque ne s'y développe pas.

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

I. — Dans les crachats, les exsudats albumineux, le Pneumocoque peut conserver longtemps sa vitalité et sa virulence et même résister à une dessiccation prolongée (Bordoni); de même le Pneumocoque semble capable de vivre assez longtemps dans la terre, les poussières : Emmerich a trouvé un Pneumocoque virulent dans les poussières de l'entrevous d'une salle où se trouvaient des pneumoniques;

Uffelmann aurait rencontré le Pneumocoque dans l'air d'une cave.

II. — Dans les cultures, le Pneumocoque perd rapidement sa virulence et même sa vitalité. Les cultures sur sérum solidifié et sur gélose meurent au bout de quatre à cinq jours ; dans les cultures en milieux solides, la vitalité persiste plus longtemps, mais la virulence a disparu le septième jour. L'atténuation se produit d'autant plus vite que le milieu convient moins au Pneumocoque ; elle est plus tardive dans les cultures en bouillon-sang que dans le bouillon ordinaire. D'après Bezançon et Griffon, le Pneumocoque peut vivre une année dans du sang défibriné mélangé de sérosité ascitique (1).

La virulence s'affaiblit rapidement dans les cultures successives, elle disparaît dès la troisième culture.

Les cultures sont stérilisées en vingt-quatre heures par une température de 42°, en dix minutes à 56°, instantanément à 65°-70° ; la dessiccation les tue rapidement.

Pasteur a montré que l'atténuation des cultures est due en grande partie à l'action de l'oxygène de l'air. Il en résulte que le Pneumocoque conserve plus longtemps sa virulence dans les cultures anaérobies (Fränkel) ; dans les cultures en œuf pratiquées comme il est dit page 55 (A), il resterait actif pendant plusieurs mois (Bunzl-Federn). Un procédé efficace pour conserver du Pneumocoque virulent consiste à inoculer la culture à un lapin, puis à prélever à l'autopsie un peu de sang du cœur et à l'inclure dans une pipette scellée ; le sang garde ainsi sa virulence pendant fort longtemps; pour l'utiliser, on commence par pratiquer un ensemencement en bouillon, puis on inocule la culture obtenue au bout de vingt-quatre à trente-six heures.

Une autre cause d'atténuation et de mort du Pneumocoque dans les cultures est le développement rapide d'une acidité notable due en grande partie à de l'acide formique. L'addition de carbonate de chaux aux milieux de culture produit la saturation de l'acide à mesure de sa formation et permet de conserver le Pneumocoque vivant pendant plus d'un mois (Wurtz et Mosny).

Restitution et exaltation de la virulence. — *a*. On peut restituer sa virulence à un pneumocoque affaibli en injectant au lapin une quantité assez considérable (un centimètre cube) de culture en bouillon associée à une quantité égale de culture filtrée de *Proteus vulgaris* : l'animal succombe à la septicémie pneumococcique et son sang contient le microbe virulent.

(1) Dans ce milieu, le Pneumocoque prend l'aspect en chaînettes; repiqué ensuite sur gélose ou en bouillon, il conserve héréditairement cet aspect, mais reprend sa forme en diplocoques dans le sérum de lapin.

b. Les passages successifs par le lapin augmentent la virulence du Pneumocoque; l'inoculation intraveineuse convient mieux dans ce but que l'inoculation sous-cutanée, mais le procédé le plus sûr est celui d'Issaëff, par les inoculations intrapéritonéales.

On injecte dans le péritoine d'un lapin A, 1 centimètre cube à $1^{cc},5$ du sang d'un lapin qui vient de succomber à la septicémie pneumococcique; on fait un deuxième passage avec le sang du lapin A, et on continue la série jusqu'au huitième ou neuvième passage; à partir de ce moment on diminue la dose de sang injectée dans le péritoine; pour le onzième lapin, par exemple, il suffira d'inoculer 6 à 8 gouttes de virus.

A partir du douzième passage environ le sang perd la propriété de se coaguler et devient extrêmement toxique et virulent; les Pneumocoques y abondent. Une goutte de ce sang introduite dans le péritoine d'un lapin suffit pour le tuer en dix ou douze heures; si l'on augmentait la dose d'une manière trop considérable, si on injectait par exemple 1 à 2 centimètres cubes, le lapin succomberait très rapidement (cinq à six heures) à l'intoxication par les toxines contenues dans le sang, mais non à l'infection pneumococcique.

L'injection sous-cutanée de 4 à 6 gouttes de sang à virulence exaltée tue le lapin en douze à quinze heures. Au bout d'un grand nombre de passages par le péritoine du lapin, la virulence du Pneumocoque s'affaiblit, mais il suffit de deux ou trois passages intrapéritonéaux chez des cobayes ou des chiens pour rétablir toute la force du virus.

§ 2. — TOXINES.

I. — Les cultures filtrées de Pneumocoque sont peu actives et il faut en injecter de grandes quantités dans les veines du lapin pour obtenir des effets toxiques se traduisant par une élévation passagère de la température et une diminution de poids; d'ordinaire la mort ne survient pas. On obtient des résultats un peu plus satisfaisants en tuant les microbes dans les cultures par le chloroforme ou par la chaleur (une température de 58°, pendant deux heures, suffit pour détruire le Pneumocoque sans altérer la toxine). Le sérum du sang du lapin jeune est le milieu qui donne les cultures les plus toxiques.

Les cultures à l'abri de l'air, celles faites dans du bouillon ou du sérum maintenus alcalins n'ont aucun avantage au point de vue de la production de la toxine.

En précipitant par l'alcool ou le sulfate d'ammoniaque des cultures en bouillon filtrées, les frères Klemperer ont isolé une toxine; le fait a été confirmé par Foa et Carbone. Andréini attribue la toxicité des cultures à une base alcaloïdique.

II. — Emmerich obtient une toxine plus active en broyant et exprimant les organes de lapins ayant succombé à la septicémie

pneumococcique et en filtrant à la bougie le suc obtenu ; Mosny modifie ainsi le procédé d'Emmerich :

Aussitôt après la mort, les organes des lapins sont hachés et mis à macérer dans le double de leur poids d'eau ; on ajoute quelques fragments de thymol pour empêcher la putréfaction. Au bout de vingt-quatre heures, le liquide est filtré plusieurs fois sur papier puis sur une bougie Chamberland.

III. — Issaëff retire du sang des lapins ués par son Pneumocoque exalté (Voy. plus haut) une toxine capable de tuer le lapin, par injection intraveineuse, à la dose de 1 p. 100 du poids de l'animal. Il opère de la manière suivante :

1° Recueillir purement, dans le cœur, le sang de trois ou quatre lapins ayant récemment succombé à l'inoculation du Pneumocoque virulent (on doit obtenir de 80 à 100 grammes de sang) et réunir dans un vase stérilisé les divers échantillons de sang obtenus.

2° Ajouter au sang son volume d'eau stérile, glycérinée à 1 p. 100 et additionnée, pour 100 centimètres cubes, de 5 à 6 gouttes d'une solution saturée de bicarbonate de sodium. Mélanger.

3° Filtrer le mélange sur une bougie Chamberland.

La toxicité du produit diminue considérablement par un chauffage à 70° et disparaît à 100°.

En filtrant les exsudats péritonéaux et pleuraux de lapins ayant succombé à l'inoculation de virus exalté, Issaëff a également obtenu une toxine assez active pour tuer le lapin.

§ 3. — VACCINATION.

I. **Par les toxines.** — En injectant à l'animal des cultures filtrées ou des toxines obtenues par les procédés d'Emmerich, de Mosny et d'Issaëff, on peut le vacciner contre le Pneumocoque, mais l'immunisation ainsi produite dure peu et pour la prolonger il faut injecter des cultures vivantes à l'animal rendu réfractaire.

A. — Chauffer à 58° le sérum des lapins qui viennent de succomber à l'infection pneumococcique et injecter dans la veine auriculaire d'un lapin neuf des doses de ce sérum allant de 10 à 20 centimètres cubes ; au bout de quatre à cinq inoculations répétées à intervalle de quelques jours, l'animal résiste à l'inoculation de cultures virulentes (Foa).

B. — On arrive au même résultat en injectant de la même façon des toxines obtenues par les procédés d'Emmerich ou de Mosny.

C. — Issaëff rend les lapins réfractaires en leur injectant successivement dans le sang des doses de 10 à 50 centimètres cubes de cultures stérilisées (bouillon ou sérum). Ces injections provoquant une réaction assez intense, il ne faut pratiquer la deuxième inoculation que lorsque les animaux paraissent guéris de la première.

Le même auteur a également immunisé des lapins en leur injectant des toxines retirées du sang par le procédé exposé plus haut; il suffit d'une seule injection de 10 centimètres cubes de toxine dans le sang ou le péritoine des lapins pour les rendre réfractaires à un haut degré à l'infection pneumococcique.

Issaëff soumet les animaux immunisés à une double épreuve à l'aide de sang frais de lapin venant de succomber à la pneumococcie; il inocule sous la peau la première fois 2 à 4 gouttes et la seconde $0^{cc},5$ de sang virulent. Pour maintenir l'immunité on doit répéter ces inoculations tous les mois, sans jamais dépasser la dose de $0^{cc},5$ sous la peau. Il importe, pour l'inoculation d'épreuve, d'attendre que l'animal soit complètement remis des malaises liés à l'immunisation et particulièrement que le poids ait repris une marche ascendante.

Les lapins vaccinés par les toxines sont complètement réfractaires à l'infection par les cultures vivantes, mais ils gardent leur sensibilité vis-à-vis des toxines et réagissent même plus énergiquement que les lapins neufs quand on leur injecte ces toxines.

II. **Par les cultures atténuées.** — On peut immuniser les animaux en leur inoculant des cultures vivantes atténuées par le vieillissement ; on injecte, par exemple, d'abord des cultures en bouillon âgées de cinq à six jours, pour arriver à donner, après des inoculations intermédiaires, des cultures de vingt-quatre heures ou du sang virulent (Foa et Scabia, Netter).

§ 4. — SÉROTHÉRAPIE.

I. — Le sang des animaux naturellement réfractaires ne possède aucune propriété thérapeutique ni immunisante.

II. — Le sang des animaux vaccinés n'est pas antitoxique ; il est incapable de stériliser les toxines du Pneumocoque *in vitro*, ou dans l'organisme (Issaëff).

Pour démontrer ce fait, on mélange *in vitro* du sérum de lapin vacciné avec un volume égal d'une toxine active. On injecte le mélange dans la veine auriculaire d'un lapin neuf; un lapin témoin reçoit la même quantité de toxine mélangée à du sérum normal. Les deux lapins réagissent d'une manière analogue.

III. — Le sérum des animaux vaccinés ne possède, *in vitro*, aucune action bactéricide sur le Pneumocoque; il permet le développement de ce microbe qui y conserve toute sa virulence, malgré quelques modifications de forme (Behring et Nissen, Issaëff) ; les cultures sont un peu grêles, les formes arrondies y dominent, les microbes sont agglutinés.

Quand on veut vérifier la virulence d'un Pneumocoque cultivé dans le sérum d'un animal vacciné, il faut se mettre à l'abri de la cause d'erreur

liée à l'inoculation de la culture entière. Cette culture se compose de deux éléments; 1° les microbes ; 2° le sérum où ils ont poussé; or ce sérum a, comme nous le verrons tout à l'heure, la propriété de conférer l'immunité; si on injecte la culture entière on immunise l'animal avec le sérum en même temps qu'on l'inocule avec les microbes, l'animal guérira et on conclura à l'action bactéricide du sérum. Pour éviter cette erreur il faut recourir à l'un des artifices suivants :

a. Ensemencer une trace de la culture en sérum dans un tube de bouillon neuf et inoculer la culture fille ainsi obtenue; ce procédé peut prêter à la critique.

b. Jeter sur un filtre de papier stérilisé la culture en sérum ; laver deux ou trois fois les microbes restant sur le filtre avec de la solution aqueuse stérilisée de NaCl à 7 p. 1 000; recueillir le résidu sur le filtre avec un pinceau, le délayer dans 2 centimètres cubes de la solution stérile à 7 p. 1 000 de NaCl et injecter le mélange sous la peau.

IV. — Inoculé sous la peau chez un animal neuf, le sérum des animaux vaccinés le préserve contre l'infection pneumococcique et semble même capable de guérir l'infection déclarée. Cette action est indépendante de toute influence bactéricide ou antitoxique et relève de la phagocytose.

Le sérum du lapin vacciné est très actif : 2 à 4 gouttes de sérum d'un lapin solidement vacciné suffisent pour immuniser une souris (Foa et Carbone).

G. et F. Klemperer ont arrêté la septicémie pneumococcique chez le lapin infecté depuis vingt-quatre heures en lui injectant 8 centimètres cubes de sérum de lapin vacciné.

Les mêmes auteurs ont constaté qu'au moment de la crise, dans la pneumonie humaine, le sérum de l'homme, toxique pendant la période fébrile, devient immunisant et thérapeutique.

Applications thérapeutiques. — Les résultats obtenus sur les animaux encourageaient à essayer chez l'homme la sérothérapie de la pneumonie ; plusieurs auteurs ont injecté à l'homme du sérum de lapin vacciné ou d'un pneumonique arrivé au moment de la crise ; les résultats obtenus, bien que satisfaisants, ne sont pas encore assez démonstratifs pour que cette méthode de traitement se soit généralisée, la production du sérum antipneumonique étant d'ailleurs fort malaisée.

Klemperer a établi l'innocuité du sérum antipneumonique inoculé à l'homme sain; chez des pneumoniques il injecta sous la peau des doses de 6 centimètres cubes de sérum de lapin vacciné et obtint des résultats favorables. Foa et Carbone provoquèrent la crise au quatrième jour par deux injections consécutives de 5 centimètres cubes de sérum de lapin vacciné. Foa et Scabia, Janson obtinrent de même une amélioration rapide dans plusieurs cas de pneumonie par l'injection de 5 à 25 centimètres cubes de sérum de lapin vacciné.

Audéoud a injecté avec succès à des pneumoniques des doses de 2 à 4 centimètres cubes de sang provenant de pneumoniques ayant fait leur crise; dans deux cas il a obtenu une amélioration considérable et la chute de la température dans les quinze heures qui ont suivi l'injection. Bouchard, Roger, Charrin, Maragliano ont obtenu des effets favorables dans les mêmes circonstances.

Pour ces recherches on peut prélever sans inconvénient du sang chez les pneumoniques entrant en convalescence, en employant la technique exposée page 193 : le sang est puisé dans une veine du pli du coude à l'aide de la seringue de Debove.

Agglutination. — Dans les affections à Pneumocoque, le sérum de l'homme et des animaux acquiert la propriété d'agglutiner le Pneumocoque. Le pouvoir agglutinant reste toujours faible et ne peut être démontré par le procédé de Widal ; il apparaît dans les cultures en sérum non dilué (Bezançon et Griffon).

Le sérum recueilli purement ne doit pas être imprégné d'hémoglobine. Il est ensemencé avec une trace de culture en sérum de lapin neuf et est placé à l'étuve à 37° pendant quinze à seize heures.

L'agglutination peut être macroscopique, ou ne devenir évidente qu'à l'examen microscopique ; elle est très visible sur une goutte de culture étalée, séchée et colorée (aspect en tête de méduse, de Bezançon et Griffon). Dans le sérum normal d'homme, de lapin, de chien, l'agglutination ne se produit jamais.

Dans les pneumonies, broncho-pneumonies, angines à Pneumocoque, etc., la réaction est toujours positive, mais elle diminue à la défervescence et disparaît vite.

La réaction ne se manifeste pas avec tous les Pneumocoques, elle est en quelque sorte *individuelle*; très souvent les Pneumocoques du laboratoire donnent des résultats négatifs et on n'obtient l'agglutination qu'avec le microbe isolé du malade (Bezançon et Griffon).

LE DIPLOCOQUE INTRACELLULAIRE.

Sous le nom de *Diplococcus intracellularis meningitidis* (1), Weichselbaum a décrit un microbe qui semble l'agent de la méningite cérébro-spinale épidémique ; il convient de dire cependant que le microbe de Weichselbaum n'a pu être incriminé dans tous les cas de méningite cérébro-spinale épidémique et que parfois le liquide céphalo-rachidien contient du Pneumocoque type (Wolf). Les recherches de Weichselbaum ont été confirmées par de nombreux auteurs (Jaeger, Scherer, Bonome, Bezançon et Griffon, etc.). Schiff a trouvé le Méningocoque dans les fosses nasales d'individus sains.

Maladie expérimentale. — Le lapin et la souris sont réceptifs et présentent les réactions que nous avons étudiées à propos du Pneumocoque Le lapin jeune est plus sensible que le lapin adulte.

(1) Synonymie : *Méningocoque ; Streptococcus meningitis capsulatus.*

Le cobaye ne succombe qu'à l'inoculation de fortes doses de cultures virulentes dans le péritoine ou les poumons.

Recherche et diagnostic. — Chez l'homme vivant, recueillir du liquide céphalo-rachidien par ponction lombaire (Voy. p. 201); examiner aussi le mucus nasal. Sur les cadavres, rechercher le microbe dans le sang, les exsudats méningés, le liquide céphalo-rachidien, etc.

Préparer des lamelles pour l'examen microscopique; cultiver en sérum de lapin jeune et inoculer à la souris et au lapin.

Un des caractères les plus importants pour le diagnostic est l'inclusion de la plupart des microbes à l'intérieur des leucocytes; la présence presque exclusive dans les cultures en bouillon âgées de trois à cinq jours de longues chaînettes à éléments assez régulièrement arrondis, l'agglutination des cultures en sérum normal de lapin jeune sont aussi de bons caractères.

Aspect microscopique. — Dans les *exsudats* le Méningocoque se présente sous la forme de diplocoques lancéolés, rappelant l'aspect du Pneumocoque et parfois celui du Gonocoque; çà et là on trouve quelques grains isolés ou de très courtes chaînettes. Certains éléments semblent dépourvus de capsule. Le plus grand nombre des méningocoques se trouvent inclus dans le protoplasma des leucocytes ou des globules de pus.

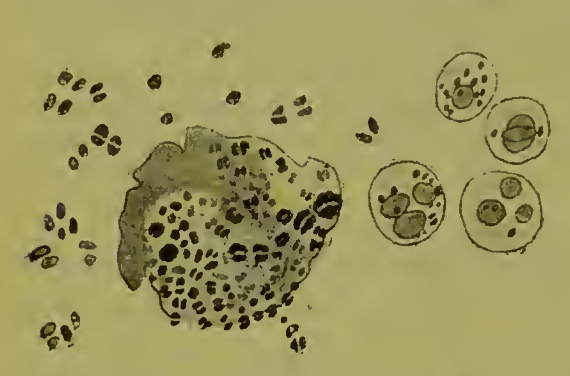


Fig. 189. — Pus de méningite cérébro-spinale, d'après Weichselbaum.

Dans les *cultures* en milieux liquides on trouve, à côté de quelques grains isolés, de nombreuses chaînettes, parfois très longues, constituées par des éléments arrondis et qui ne sont pas groupés par paires aussi nettement que dans les chaînettes du Pneumocoque. Le microbe est capsulé dans les cultures en milieux albumineux.

Coloration. — Le Méningocoque se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram; cependant, dans les lamelles préparées avec les exsudats, de nombreux microbes se décolorent quand on les soumet à l'épreuve de cette méthode : ce sont vraisemblablement des cadavres de Méningocoques ayant subi un commencement de désintégration.

Cultures. — Le Méningocoque ne cultive pas à la température ordinaire (1); la température optima est 37°.

Indifféremment aérobie, il aime les milieux qui conviennent au Pneumocoque. Il perd rapidement, au moins pour le diplocoque type, sa virulence dans les milieux de culture ordinairement employés. Nous n'insisterons pas sur les caractères des cultures en *bouillon*, sur *gélose*, *sérum coagulé*, qui se rapprochent de ceux des cultures du Pneumocoque. Dans le sérum liquide de *lapin jeune et neuf*, on observe un phénomène important: la culture est abondante, composée de chaînettes, mais il se produit une véritable *agglutination* analogue à celle que l'on observe en cultivant le Pneumocoque dans le sérum de lapin immunisé.

(1) Thiercelin et Rosenthal ont étudié un échantillon de Méningocoque qui poussait sur gélatine à 15°; mais par d'autres caractères ce microbe semble se différencier du Diplocoque de Weichselbaum.

L'ENTÉROCOQUE.

Escherich, Taval, Eguet ont signalé depuis longtemps des streptocoques encapsulés dans l'intestin des nouveau-nés; en 1894-1897 nous avons étudié chez deux malades atteints de suppurations post-typhoïdiques (pleurésie purulente, arthrites suppurées multiples) un nouveau « streptocoque encapsulé ». C'est ce microbe qui a été définitivement décrit par Thiercelin sous le nom d'*Entérocoque.*

L'Entérocoque de Thiercelin cause un grand nombre d'entérites et d'entéro-colites chez les enfants, l'entérite muco-membraneuse de l'adulte; il semble jouer un rôle dans la pathogénie de l'appendicite, de l'embarras gastrique, de certains ictères; il cause certaines complications de la fièvre typhoïde, etc. Il est un hôte habituel de l'intestin, à l'état normal.

Maladie expérimentale. — La souris est très sensible; après l'inoculation sous-cutanée, elle succombe en vingt-quatre heures à la septicémie; on trouve l'Entérocoque dans le sang et le contenu diarrhéique de l'intestin.

Le lapin est moins réceptif; il ne succombe qu'à l'inoculation de fortes doses de cultures en bouillon; les lésions intestinales (diarrhée, sécrétion de mucus) sont constantes. L'Entérocoque que nous avons isolé du pus d'un typhique tuait le lapin en quinze à vingt jours avec des suppurations articulaires multiples (inoculation intraveineuse).

Le cobaye n'est pas réceptif (Thiercelin); cependant, d'après Rosenthal, « les cobayes tués par injection intraveineuse » présentent des lésions intestinales.

Recherche et diagnostic. — Dans les selles normales on recherche l'Entérocoque par l'examen microscopique; les cultures échouent d'ordinaire.

Dans le pus, les selles de l'entérite, l'examen microscopique donne souvent l'apparence d'une culture pure de Pneumocoque. Les cultures sont aisées à réussir; on pourra pratiquer des isolements sur gélatine ou gélose, puis des ensemencements en bouillon. Les inoculations seront pratiquées avec une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures chez la souris et le lapin.

Le diagnostic sera basé sur plusieurs points : 1° culture à la température ordinaire; 2° culture minime en sérum liquide; 3° culture minime à l'abri de l'air; 4° formes nombreuses en streptocoques dans les cultures.

Caractères microscopiques. — Dans les *selles normales*, l'Entérocoque se présente sous l'aspect d'un diplocoque à grains arrondis ou plus ou moins lancéolés, de volume très variable, rarement encapsulés.

Dans le pus, les *selles de l'entérite*, la forme est la même, mais beaucoup de grains sont encapsulés, on trouve aussi des chaînettes de deux diplocoques. Thiercelin a décrit des formes en diplobacilles.

Dans les *cultures* jeunes, on trouve de nombreux diplocoques et de courtes chaînettes; plus tard les chaînettes deviennent longues et sont réunies en amas, comme agglutinées.

Coloration. — L'Entérocoque se colore aisément par les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram.

Cultures. — L'Entérocoque cultive à la température ordinaire; la température optima est de 35°-37°. Le sérum liquide convient mal; le bouillon est très favorable. L'Entérocoque pousse mal à l'abri de l'air. Dans les cultures en milieux liquides, il conserve fort longtemps sa vitalité et sa virulence : Thiercelin a pu réensemencer au bout de plusieurs semaines une

culture en bouillon; nous-même avons obtenu la mort chez le lapin avec une culture de sixième passage en bouillon-sang.

D'après Thiercelin, l'Entérocoque formerait des spores.

Bouillon. — Trouble au bout de vingt-quatre heures, puis le liquide s'éclaircit et il se forme au fond du tube un dépôt muqueux blanchâtre.

Bouillon-sang. — D'abord trouble léger, puis séparation d'une gangue muqueuse englobant de nombreux microbes, flottant pendant douze jours dans le liquide puis tombant au fond du vase. Chaînettes, diplocoques capsulés.

Sérum liquide. — Culture grêle, petit dépôt glaireux formé par des grains et des chaînettes encapsulés.

Gélose. — Petits points arrondis, d'abord transparents puis opaques, donnant l'aspect d'une culture de Streptocoque.

Gélatine. — Petits points blancs, opaques, arrondis, analogues aux colonies de Streptocoque. Pas de liquéfaction.

Lait. — Culture très grêle; pas de coagulation.

Pomme de terre. — Pas de développement apparent; le raclage et l'examen microscopique de la surface de la pomme de terre dénotent un développement évident.

En résumé :

L'Entérocoque présente un certain polymorphisme; il est intermédiaire au Pneumocoque (aspect microscopique) *et au Streptocoque pyogène* (caractères des cultures) *et forme une transition entre ces deux espèces.*

CHAPITRE XVI

LE PNEUMOBACILLE DE FRIEDLÄNDER

Si le Pneumobacille n'est pas, comme l'avait cru Friedländer, l'agent de la pneumonie, il n'en a pas moins gardé une place importante en pathologie.

Il est l'agent de certaines broncho-pneumonies, péricardites, pleurésies; il cause de nombreuses suppurations : otites, parotidites, dacryocystites, stomatites; Ch. Nicolle et Hébert ont attiré l'attention sur les angines pseudo-membraneuses causées par le Pneumobacille; il peut également s'associer au Bacille de la diphtérie.

A l'état sain, la salive de beaucoup d'individus (4,5 p. 100 d'après Netter) contient le Pneumobacille. Il semble très répandu dans les milieux extérieurs; Uffelmann l'a trouvé dans l'air, Emmerich dans les poussières; Grimbert a signalé sa présence dans certaines eaux; Hébert et Nicolle l'ont rencontré dans les vases de la Seine à Rouen, nous-même dans de nombreux échantillons d'eau de diverses provenances.

Il n'y a plus lieu aujourd'hui de distinguer du Pneumobacille le microbe décrit par Escherich sous le nom de *Bacillus lactis aerogenes*; la démonstration de l'identité des deux bacilles ébauchée par Denys et Martin vient d'être complétée par Grimbert et Legros (1). De ce fait l'importance pathologique du Pneumobacille se trouve considérablement augmentée.

Le *Bacillus lactis aerogenes* a été signalé dans les matières fécales, dans le sol, l'eau, l'air. C'est un des agents de la fermentation du lait; il semble causer certaines entérites des nourrissons; il joue un rôle important dans les infections urinaires.

Article I. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

La souris et le cobaye sont très réceptifs au Bacille de Friedländer; le lapin est beaucoup moins sensible.

(1) Sans insister sur les faits qui ont permis de conclure à l'identité des deux microbes, nous rappellerons, d'après Grimbert et Legros, les caractères qui leur sont communs : immobilité, capsules, non-liquéfaction de la gélatine, action pathogène identique, non-production d'indol dans les cultures, action identique sur les sucres.

Souris. — L'inoculation sous-cutanée de quelques gouttes de culture amène la formation d'un abcès à pus crémeux, filant ; puis le bacille se généralise et l'animal succombe en un à trois jours. A l'autopsie, la rate est hypertrophiée, le bacille se rencontre dans le sang et tous les organes. L'inoculation dans le poumon entraîne également la mort avec formation d'un foyer de broncho-pneumonie.

Cobaye. — L'inoculation sous-cutanée de doses faibles de culture produit un abcès au point d'inoculation ; cet abcès s'ouvre à l'extérieur, donnant issue à un pus épais, contenant le Pneumobacille. A la dose d'un centimètre cube, les cultures en bouillon tuent le cobaye ; il se produit un abcès au point d'inoculation et la mort survient plus ou moins rapidement avec des lésions de broncho-pneumonie et une généralisation du bacille.

Lapin. — Une dose de plusieurs centimètres cubes de culture en bouillon injectée dans la veine marginale de l'oreille tue le lapin en peu de jours, le bacille se retrouve dans le sang et les organes. L'inoculation sous-cutanée est peu active.

Ch. Nicolle et Hébert, en ensemençant le bacille, après excoriation, sur la muqueuse vulvaire d'une lapine, ont obtenu de la tuméfaction des grandes lèvres et un exsudat blanc, riche en Pneumobacilles.



Fig. 190. — Pneumobacille de Friedländer. — Crachats. — Thionine phéniquée. 1000/1.

ARTICLE II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Bacille de Friedländer se présente sous la forme de petits bâtonnets très courts, un peu larges, dont la longueur moyenne n'excède pas 1 à 2 μ. Quelquefois, cependant, dans les cultures, à côté de ces formes cocco-bacillaires, on rencontre des formes longues et même filamenteuses. Les bâtonnets sont fréquemment réunis par deux. Ils sont toujours immobiles et ne présentent jamais de spores.

Dans le pus, les crachats, le sang, le Pneumobacille présente une capsule bien visible, analogue à celle du Pneumocoque. Cette capsule

est moins nette, mais existe dans les cultures sur les milieux artificiels (Grimbert, Nicolle et Hébert).

Coloration. — Le Pneumobacille se colore aisément par les couleurs basiques. Il ne prend pas le Gram. Pour la coloration des capsules, employer les procédés décrits pour le Pneumocoque.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Anaérobie facultatif, le Pneumobacille cultive sur tous les milieux. Il se développe à partir de + 15° : la température optima de culture est aux environs de 37°. Il tolère les milieux légèrement acides.

Bouillon. — En vingt-quatre heures à 37°, apparition d'un trouble léger et formation d'un voile visqueux, surtout marqué sur les bords du tube où il forme un anneau ; puis le voile tombe au fond du tube, le bouillon reste trouble et devient visqueux.

Gélatine. — *Piqûre.* — A 20°, dès le second jour, formation d'une petite colonie blanche, saillante à la surface de la gélatine, puis la culture s'étend le long de la piqûre et prend l'aspect typique de la *culture en clou.* Il ne se produit pas de liquéfaction. On voit souvent des bulles de gaz se dégager autour de la culture.

Colonies isolées. — Vers le troisième jour apparaissent de petites colonies rondes, granuleuses, blanchâtres, devenant légèrement saillantes.

Fig. 191. — Pneumobacille. — Culture en gélatine, septième jour.

Gélose. — *Sérum coagulé.* — Strie blanche, épaisse et visqueuse.

Pomme de terre. — Strie épaisse, jaunâtre, visqueuse avec production de bulles de gaz.

Lait. — Coagulation parfois rapide, quelquefois lente. Au premier passage certains échantillons ne coagulent pas le lait, mais ils acquièrent la propriété coagulante au bout de quelques passages dans ce milieu (Denys et Martin).

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité et virulence. — Dans les cultures, le Pneumobacille est tué rapidement à 60°-80° ; il résiste beaucoup mieux dans les

matières albuminoïdes desséchées. Dans l'eau, le sol, il semble conserver longtemps sa vitalité et sa virulence. La virulence des divers échantillons de Pneumobacille est sujette à de nombreuses variations dont on ne peut encore préciser les causes ; il y a peut-être lieu d'admettre différentes races du microbe : le *Bacillus lactis aerogenes* pourrait constituer une de ces races.

Toxine. — Les cultures filtrées renferment une substance toxique pouvant tuer le lapin avec des symptômes de paralysie, de la congestion et des hémorragies intestinales.

Produits de fermentation. — Dans la solution de peptone à 3 p. 100, neutralisée, le Pneumobacille ne produit pas d'indol. Il prépare des nitrites aux dépens des nitrates.

Le Pneumobacille fait fermenter la glycérine et les sucres : glycose, galactose, arabinose, mannite, dulcite, saccharose, lactose, maltose, raffinose, dextrine ; il est sans action sur l'érythrite. Frankland a décrit une race qui ne fait pas fermenter la glycérine.

Les produits de la fermentation provoquée par le Pneumobacille sont : l'alcool éthylique, l'acide acétique, l'acide lactique gauche et l'acide succinique.

Pour observer et étudier la fermentation des sucres sous l'influence du Pneumobacille, Grimbert recommande le milieu suivant :

Sucre fermentescible....................	3 grammes.
Peptone sèche	2 —
Eau....................................	100 centimètres cubes.
Carbonate de chaux....................	Q. S.

L'apparition de bulles gazeuses rend manifeste le fermentation ; en remplaçant le carbonate de chaux par de la teinture de tournesol, la teinte bleue vire au rouge par la fermentation ; avec la glycérine, la fermentation est toujours plus lente à s'établir.

Article IV. — RECHERCHE ET DIAGNOSTIC.

I. **Dans les crachats.** — *a.* Examen microscopique des lamelles colorées à la thionine ou au violet de gentiane phéniqués. S'assurer que le bacille se décolore par la méthode de Gram.

b. Inoculation d'une parcelle de crachat à la souris.

II. **Dans le sang, le pus, etc.** — L'examen microscopique, les ensemencements, les inoculations à la souris permettront de faire facilement le diagnostic.

III. **Dans les angines pseudo-membraneuses.** — *a.* Examiner les frottis de fausses membranes après coloration simple et avec la méthode de Gram.

b. Pratiquer des ensemencements sur sérum coagulé, suivant la technique employée pour la diphtérie. En quinze à vingt heures, on

obtient des colonies assez grosses, rondes, grisâtres, visqueuses, faciles à reconnaître à l'œil nu et à l'examen microscopique.

IV. **Dans les eaux.** — Employer la méthode des passages phéniqués (Voy. chap. XXI) ou en gélo-pepto-sel; après deux à trois passages faire un isolement sur plaque de gélatine : les colonies de Pneumobacilles, rondes, saillantes, d'un blanc mat, se reconnaissent aisément; ensemencer une de ces colonies en bouillon et au bout de la quarante-huitième heure essayer la virulence de la culture sur la souris. Les ensemencements pratiqués avec le sang de la souris permettront d'obtenir des cultures pures.

Diagnostic avec le Pneumocoque. — Le Pneumobacille se distingue aisément du Pneumocoque de Talamon-Fränkel par les caractères de ses cultures et par le fait qu'il ne prend pas le Gram.

Diagnostic avec le Colibacille. — Dans les analyses d'eau on est exposé à confondre le Pneumobacille avec le *Bacterium coli*; l'erreur sera facilement évitée en se rapportant aux caractères suivants :

Pneumobacille.	*Colibacille.*
Immobile dans les cultures en bouillon.	Mobile dans les cultures en bouillon.
Possède une capsule très marquée dans les humeurs et tissus, moins visible dans les cultures.	Ne possède jamais de capsule.
Ne produit pas d'indol dans l'eau peptonisée.	Produit de l'indol dans l'eau peptonisée.
Fait fermenter la glycérine.	Ne fait pas fermenter la glycérine.

LE BACILLE DU RHINOSCLÉROME.

Le Bacille du rhinosclérome a été découvert par V. Frisch. Le rhinosclérome est une maladie chronique caractérisée par l'épaississement de la muqueuse et du squelette du nez; il peut envahir le pharynx, le larynx et même la bouche et amener la mort par asphyxie.

Le Bacille du rhinosclérome est, par ses caractères morphologiques, très analogue au Pneumobacille; Netter et Gunther veulent réunir ces deux microbes dans la même espèce; cependant il existe des différences telles dans les propriétés de chacun d'eux qu'on ne peut les identifier complètement.

Aspect microscopique. — Dans les coupes des tumeurs de rhinosclérome on voit à l'intérieur de cellules volumineuses, à noyau en croissant rejeté à la périphérie, des cocco-bacilles encapsulés dont la forme et les dimensions rappellent celles du Pneumobacille.

Cultures. — Le Bacille de V. Frisch cultive sur tous les milieux ordinairement employés. Contrairement au Bacille de Friedländer, il ne se développe pas dans les milieux légèrement acides; il ne fait pas fermenter les sucres; de plus, ses cultures sont beaucoup plus grêles que celles du Pneumobacille (Paltauf). — Dans les cultures, le Bacille de V. Frisch forme des capsules qui sont rendues apparentes par le procédé suivant : délayer sur

la lamelle un peu de culture dans une goutte d'eau acétisée à 1 p. 100, sécher, colorer par le violet d'aniline. Examiner dans l'eau.

Bouillon, gélose et sérum. — Cultures analogues à celles du Pneumobacille, mais plus grêles.

Gélatine. — Cultures filiformes, très limitées; la forme en clou ne se produit jamais.

Lait. — Pas de coagulation.

Inoculations. — Les animaux de laboratoire ne sont pas réceptifs vis-à-vis du Bacille de V. Frisch.

LE BACILLE DE L'OZÈNE.

Le bacille rencontré dans les mucosités de l'ozène par Loewenberg et Abel se rapproche tellement du Pneumobacille qu'il semble que l'identification des deux microbes s'impose.

L'aspect microscopique, les caractères des cultures, les résultats des inoculations sont les mêmes pour les deux microbes; les seules différences seraient que, à l'opposé du Bacille de Friedländer, le microbe de l'ozène ne fait pas fermenter tous les sucres et ne coagule pas le lait.

CHAPITRE XVII

LE BACILLE DE LA DIPHTÉRIE

Le Bacille de la diphtérie à été découvert par Klebs, mais la première description complète en a été donnée par Löffler. Roux et Yersin ont établi sa spécificité en conférant la paralysie aux animaux.

Le Bacille de Klebs-Löffler se rencontre dans les fausses membranes de la diphtérie humaine (angine diphtérique, croup, diphtéries nasale et cutanée, etc.). Il occasionne aussi des angines sans formation de fausses membranes, angines dont on ne peut poser le diagnostic que par l'examen bactériologique.

Le Bacille de la diphtérie se rencontre également dans la bouche et les cavités nasales des personnes ayant eu la diphtérie, et quelquefois pendant plusieurs semaines après la guérison.

Dans la bouche de beaucoup d'individus sains, on rencontre un bacille très analogue au Bacille diphtérique, mais plus court et non pathogène pour les animaux de laboratoire ; c'est le *Bacille pseudo-diphtérique*, sur lequel nous devrons revenir au cours de ce chapitre.

Le Bacille de Klebs-Löffler se rencontre uniquement dans la fausse membrane ou sur la muqueuse malade ; d'ordinaire il n'envahit pas l'organisme, on ne le trouve pas dans les viscères : il cause la mort par une véritable intoxication; cependant, dans quelques cas de diphtérie grave, plusieurs auteurs l'ont rencontré à l'autopsie, soit dans le sang, soit dans les viscères (Babès, Spronck, Paltauf, Frosch, Kutscher), ces faits sont exceptionnels. On le retrouve assez fréquemment dans les foyers de broncho-pneumonie consécutifs au croup (Löffler, Kutscher).

La diphtérie sévit parfois sur les bovidés (Klein); on rencontre parfois, chez les vaches laitières, des lésions des pis (vésicules et ulcères) contenant le Bacille de Kebs-Löffler; ce serait là une cause de transmission de la diphtérie à l'homme.

Le Bacille de la diphtérie est susceptible de se conserver dans les milieux extérieurs : Park, Wright et Emerson l'ont trouvé dans les poussières de salles où des diphtéritiques étaient en traitement et sur les vêtements des infirmiers ; Abel l'a rencontré sur des jouets ayant été entre les mains d'un enfant atteint de diphtérie, etc.

ARTICLE I. — DIPHTÉRIE EXPÉRIMENTALE.

§ 1er. — RÉCEPTIVITÉ. — SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

Cobaye. — Le cobaye est l'animal de choix pour l'étude de la diphtérie expérimentale. L'inoculation peut être faite sous la peau, dans le péritoine, dans la trachée ou sur les muqueuses.

Inoculation sous-cutanée. — Les cultures en bouillon, âgées de vingt-quatre à quarante-huit heures, injectées sous la peau à la dose de un demi à un centimètre cube, tuent le cobaye en vingt-quatre à soixante-douze heures, suivant le degré de virulence du bacille. Il se produit rapidement un léger œdème au point d'inoculation ; la température s'élève, l'animal présente de l'oppression et succombe bientôt.

Quand les cultures sont peu virulentes, le cobaye peut échapper à la mort : il se produit de l'œdème au point d'inoculation ; puis il se forme une escarre. L'escarre s'élimine et l'animal guérit.

Dans l'œdème sous-cutané les bacilles pullulent jusqu'à la sixième ou huitième heure qui suit l'inoculation ; à partir de ce moment, leur multiplication s'arrête, leur nombre décroît progressivement, si bien qu'à l'autopsie on ne trouve plus qu'une quantité relativement faible de bacilles dans la sérosité de l'œdème.

Le bacille ne passe jamais dans le sang ni dans les viscères. On note à l'autopsie une congestion intense des viscères, particulièrement des capsules surrénales et un épanchement séreux abondant dans les plèvres (pouvant atteindre jusqu'à 15 centimètres cubes); cet épanchement a parfois une teinte hémorragique, il ne contient pas de bacilles.

Inoculation intrapéritonéale. — Elle est moins sévère que l'inoculation sous-cutanée ; la mort survient plus tardivement, en quatre à douze jours. En dehors des lésions viscérales ordinaires, on trouve un épanchement péritonéal qui, seul, contient le bacille.

Inoculation intratrachéale. — Quand, après avoir pratiqué la trachéotomie, on excorie la muqueuse de la trachée et qu'on y porte une parcelle de culture du Bacille de Klebs-Löffler, il s'y forme des fausses membranes produisant un véritable croup et la mort survient rapidement.

Mais la condition *sine quâ non* de réussite est que la muqueuse trachéale ait été traumatisée, soit qu'on l'ait excoriée avec une pointe, soit qu'on l'ait cautérisée avec une tige métallique chauffée; sur la muqueuse saine, le bacille ne se développe pas.

Inoculation sur les muqueuses. — On peut reproduire des fausses membranes sur la conjonctive et la vulve du cobaye en portant une parcelle de culture sur la muqueuse préalablement excoriée; sur les muqueuses saines, les inoculations restent sans effet.

Lapin. — Le lapin est beaucoup moins sensible que le cobaye et ne succombe qu'à l'inoculation de cultures très virulentes.

Inoculation sous-cutanée. — L'inoculation de 2 à 3 centimètres cubes de culture en bouillon amène la mort en cinq jours environ. Il se produit de l'œdème au point d'inoculation; les lésions dominantes sont sous la dépendance de dilatations vasculaires; les viscères sont congestionnés, montrent un picté hémorragique; les ganglions de l'aine et de l'aisselle sont tuméfiés, le foie est jaune, friable et présente une dégénérescence graisseuse analogue à celle que l'on observe chez les enfants ayant succombé à la diphtérie; d'ordinaire, les poumons sont sains; on rencontre très rarement un épanchement pleural.

Inoculation intrapéritonéale. — Elle est peu sévère; la mort survient lentement après inoculation de fortes doses de cultures. Mêmes lésions que dans le cas précédent.

Inoculation intraveineuse. — L'injection de 1 à 2 centimètres cubes de culture virulente dans une veine de l'oreille entraîne la mort en vingt-quatre à soixante heures. A l'autopsie on trouve les lésions ordinaires et une néphrite aiguë. Le bacille ne pullule pas dans le sang, il est rapidement englobé par les phagocytes (Métin).

Inoculation à la surface de la peau. — En appliquant un petit vésicatoire à la face interne de l'oreille et en ensemençant un peu de culture du bacille de Klebs-Löffler sur le derme mis à nu, Roux et Yersin ont obtenu de très belles fausses membranes. La condition indispensable de succès est de préserver de la dessiccation la surface inoculée; on y arrive en enfermant l'oreille dans un petit sac de caoutchouc, en ayant soin de ne pas comprimer les vaisseaux de la base; pour arrêter le développement de la membrane, il suffit de découvrir l'oreille.

Inoculation trachéale. — Donne encore plus aisément que chez le cobaye un croup caractéristique.

Inoculation sur les muqueuses. — Mêmes effets que chez le cobaye.

Chien. — Le chien est sensible au Bacille de Klebs-Löffler.

Inoculation sous-cutanée. — Le chien succombe en trois à quatre jours à l'inoculation sous-cutanée. Roux et Yersin ont noté de l'œdème au point d'inoculation, de l'ictère, enfin une paralysie progressive; la sérosité de l'œdème contenait quelques bacilles; le sang était stérile.

Inoculation intratrachéale. — Dans un cas de Roux et Yersin, il se produisit du gonflement du cou, de l'ictère, une paralysie complète,

et la mort survint au quatrième jour. A l'autopsie, on ne trouva pas de fausses membranes dans la trachée.

Chat. — Il succombe en six à treize jours à l'inoculation sous-cutanée ; un chat nourri avec le lait provenant d'une vache diphtéritique avec ulcérations des pis a contracté la diphtérie (Klein).

Vache. — Klein a montré que la vache peut présenter de la diphtérie spontanée et contracter la diphtérie expérimentale.

Inoculées sous la peau avec une culture virulente et jeune du Bacille de Löffler, les vaches succombent avec des lésions congestives des viscères. En inoculant des cultures sur gélose, vieilles de plusieurs jours, Klein n'a pu tuer les animaux; par contre, il a observé plusieurs fois sur les pis le développement d'une éruption commençant par une papule, arrivant par la vésicule à la pustule véritable, puis s'ulcérant; le contenu des vésicules renfermait le Bacille de Klebs-Löffler et plusieurs fois le passage du bacille dans le lait a été constaté. Klein a observé la même éruption sur deux vaches qui succombèrent à l'inoculation d'une culture très virulente.

Oiseaux. — Le *pigeon* et la *poule* succombent rapidement quand on leur injecte sous la peau ou dans le muscle pectoral une culture de diphtérie en bouillon ; à la dose d'un centimètre cube, la mort arrive en moins de soixante heures. Avec des doses inférieures à 1/5 de centimètre cube, l'animal se rétablit le plus souvent; on observe quelquefois des paralysies diphtériques. A l'autopsie des animaux qui succombent, on trouve au point d'inoculation un léger enduit grisâtre et un œdème gélatineux. Quand l'injection a eu lieu dans un muscle, celui-ci est tuméfié et ses fibres ont une teinte ocreuse ; les viscères présentent une congestion intense.

Inoculés dans le larynx, ces animaux présentent un croup analogue à celui que l'on observe chez les lapins.

Les *petits oiseaux* (moineaux, pinsons, calfats, etc.) présentent une très grande sensibilité et succombent rapidement à l'inoculation sous-cutanée.

Rats et souris. — Sont réfractaires à la diphtérie.

En résumé, la Bacille de la diphtérie a pour caractère constant de ne pas envahir l'organisme des animaux réceptifs : il reste localisé au lieu d'inoculation, et à cet endroit même son développement s'arrête bientôt : les passages en série par l'animal deviennent bientôt impossibles.

§ 2. — ASSOCIATIONS MICROBIENNES.

L'importance des associations microbiennes dans la diphtérie a été mise en lumière par Roux et Yersin.

Le Bacille de Klebs-Löffler se trouve rarement à l'état pur dans les fausses membranes. Parfois les microbes qui l'accompagnent

sont en petit nombre et dénués d'importance, mais souvent on voit, à côté du bacille spécifique, un nombre considérable d'autres bactéries; ces microbes interviennent alors dans la genèse de la diphtérie et constituent des *associations* dont dépend la gravité de la maladie. Les principales de ces associations sont les suivantes :

1° **Coccus Brisou.** — Roux et Yersin, Martin, ont rencontré souvent, à côté du Bacille de Klebs-Löffler, un petit coccus qu'ils ont appelé *coccus Brisou*, du nom de l'enfant chez lequel on l'a trouvé pour la première fois. Le coccus Brisou se rencontre isolé, en diplocoques, ou en amas; il reste coloré par le Gram et, sur sérum coagulé, donne de petites colonies blanches, peu saillantes, régulièrement arrondies. « Les associations de ce coccus avec la diphtérie sont toujours bénignes. »

2° **Staphylocoques pyogènes.** — Les Staphylocoques blanc ou doré constituent une association plus grave que la précédente : les complications respiratoires sont fréquentes; dans un cas d'association au Staphylocoque doré, nous avons vu survenir, au cours de la convalescence, un phlegmon profond du cou.

3° **Streptocoque.** — Cette association est la plus grave ; la bronchopneumonie est fréquente ; les cas se terminent souvent par la mort.

Expérimentalement, Métin a montré la gravité de l'infection du cobaye par des mélanges du Bacille diphtérique avec le Staphylocoque ou le Streptocoque : le bacille pullule dans le sang, les organes, il abonde dans l'œdème au point d'inoculation.

4° **Bacterium coli.** — Le *Bacterium coli* se rencontre fréquemment dans la bouche; il est tout naturel qu'on le rencontre parfois dans les membranes diphtéritiques; cette association serait grave : trois cas observés par Blasi et Russo-Travalli se sont terminés par la mort.

Des recherches expérimentales de Blasi et Russo-Travalli, il résulte que l'association du Colibacille augmente considérablement la toxicité des cultures du Bacille de Löffler.

On a encore signalé l'association au *Pneumocoque*, au *Bacille de Friedländer*, au *Proteus vulgaris*, etc.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Bacille de Klebs-Löffler se présente sous la forme de petits bâtonnets de dimensions très variables. Relativement à leurs dimensions, on distingue trois variétés de Bacilles diphtériques :

A. — *Bacilles courts*, presque cocciformes, souvent associés par

deux, et disposés parallèlement les uns aux autres, mesurant en moyenne 2 μ de long sur 0,8 de large (fig. 192).


Fig. 192. — Bacille de la diphtérie dans les cultures, forme petite.

B. — *Bacilles moyens*, mesurant 3 à 4 μ de long sur 0,8 de large.

Ces bacilles sont disposés parallèlement ou associés par deux bout à bout; souvent encore, ils sont unis par deux à angle plus ou moins aigu de manière à figurer un V ou un accent circonflexe (fig. 193).

C. — *Bacilles longs*, dont la longueur dépasse 4 et 5 μ; ces bacilles, dans les cultures, peuvent être intriqués, enchevêtrés, en forme de véritables broussailles. Ce sont eux qui fabriquent la toxine la plus active; on les trouve dans les angines graves. Par contre, les bacilles courts sont d'ordinaire à peu près inactifs (Martin).


Fig. 193. — Bacille de la diphtérie dans les cultures, forme moyenne.

Le Bacille de la diphtérie est immobile, il est droit ou légèrement courbé; ses extrémités sont arrondies et parfois plus larges que le centre; souvent les bacilles ainsi renflés et légèrement courbés prennent un aspect caractéristique que l'on ne saurait mieux comparer qu'à celui d'un cornichon.

Dans les vieilles cultures et les membranes, on rencontre des

formes d'involution, plus ou moins renflées en forme de poire, de massue, d'haltères, etc. On ne connaît pas de spores au Bacille de Klebs-Löffler.

Coloration. — Le Bacille de la diphtérie se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline. Il prend le Gram, mais il faut avoir soin de ne pas pousser trop loin la décoloration, car la coloration du bacille ne résiste pas à l'action longtemps prolongée de l'alcool.



Fig. 194. — Bacille de la diphtérie. — Frottis de fausse membrane. — Méthode de Gram (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Dans les cultures et les frottis de membranes la coloration se fait très aisément avec le bleu composé de Roux, le bleu alcalin de Löffler ou la fuchsine de Ziehl diluée.

La méthode de Gram permet d'obtenir de belles préparations avec les frottis et coupes de fausses membranes.

Dans les bacilles colorés par le bleu de méthylène, on voit des granulations teintées autrement que le protoplasma (*corpuscules métachromatiques* de Babès; *corpuscules polaires*). Les auteurs allemands attachent à ces granulations une grande importance dans la diagnose du Bacille diphtérique.

Après coloration, le Bacille de la diphtérie, surtout dans les vieilles cultures, présente fréquemment des espaces vacuolaires irréguliers, qui ne prennent pas la couleur; ce ne sont pas là des spores.

Remarque. — Dans les préparations montées au baume, le Bacille diphtérique perd assez rapidement sa coloration; pour avoir des préparations persistantes, on colorera de la façon suivante :

1° Faire agir pendant une à trois minutes la fuchsine de Ziehl diluée. Laver à l'eau.

2° Faire agir de même façon le bleu composé de Roux. Laver, sécher, monter.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Bacille diphtérique cultive à partir de + 20°; le développement devient minime à 40° et s'arrête à 42°. La température optima est comprise entre 35° et 37°

Le Bacille de la diphtérie est aérobie; il se développe de préférence en présence d'un courant d'air. On obtient cependant un

développement lent dans les cultures anaérobies, mais la culture reste grêle et perd rapidement sa vitalité.

Bouillon. — Le bouillon de veau peptonisé donne des cultures plus riches que le bouillon de bœuf.

A 37°, au bout de douze à vingt-quatre heures, apparaissent de petits points blancs, grumeleux, adhérents aux parois du vase, puis il se forme, à la surface, un voile constitué par des amas de bacilles enchevêtrés, parmi lesquels on trouve de nombreuses formes en massue. Il se produit un précipité au fond du tube et le bouillon reste limpide.

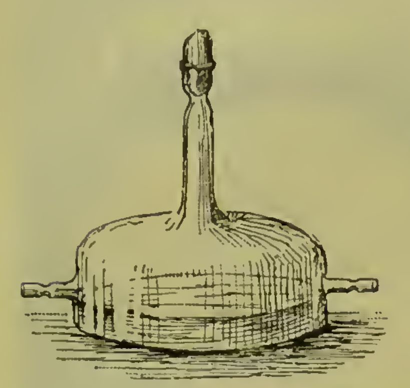


Fig. 195. — Matras de Fernbach.

On obtient une culture plus luxuriante et plus rapide en disposant le bouillon dans un matras de Fernbach (fig. 195), parcouru par un courant d'air pendant toute la durée du développement.

Pour utiliser le matras de Fernbach, on y verse par la tubulure centrale une quantité de bouillon suffisante pour en couvrir le fond sans atteindre le niveau des tubulures latérales. Ces tubulures latérales et la tubulure centrale sont bouchées à l'ouate; on stérilise à l'autoclave; l'ensemencement se pratique par la tubulure centrale, puis on la rebouche à l'ouate et on la recouvre avec un capuchon de caoutchouc. On relie une des tubulures latérales à la trompe à eau et on pratique une légère aspiration; l'air appelé par la trompe entre par la tubulure opposée et balaye incessamment la surface du bouillon.

Dans les cultures en bouillon, il se développe dès les premiers jours une acidité très prononcée; puis la réaction devient alcaline en même temps qu'il se précipite du phosphate ammoniaco-magnésien. — Dans les milieux glycérinés, la réaction acide est très marquée et persiste; le bacille perd rapidement sa vitalité dans ces milieux. — Dans le bouillon de Martin, le développement est très abondant, il ne se produit pas d'acidité du milieu et la virulence se conserve longtemps.

Sérum solidifié. — Le sérum est le milieu de choix pour la culture du Bacille de la diphtérie; le développement y est très rapide.

Colonies isolées (ensemencement en surface). — Dès la dix-huitième heure, apparition de points blancs grisâtres qui prennent rapidement le volume d'une tête d'épingle; les colonies vues par transparence paraissent plus opaques à leur centre; en vieillissant, elles s'agrandissent tout en restant régulières et se colorent parfois

en jaune pâle ; les colonies augmentent de taille les jours suivants et peuvent arriver à avoir 5 millimètres de diamètre.

Strie. — Le long de la strie, apparition de colonies analogues à celles décrites ci-dessus, devenant rapidement confluentes et formant une bande grisâtre assez large à bords irrégulièrement découpés.

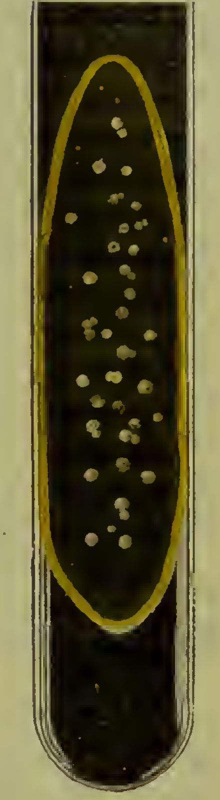


Fig. 196. — Bacille de la diphtérie. — Isolement sur sérum (24e heure).

Les cultures des bacilles longs, courts et moyens ne se distinguent pas sur sérum, cependant les colonies des bacilles courts sont parfois plus blanches, plus humides et continuent à croître à la température ordinaire ; en un mot elles sont identiques aux colonies du pseudo-bacille diphtérique d'Hoffmann.

Gélose. — Colonies fort semblables à celles qui poussent sur le sérum, parfois plus étendues et plus blanches.

Gélatine. — Sur de la gélatine dure (à 15 p. 100) à 22°-24°, on obtient un développement très grêle de petites colonies blanches, punctiformes, le long de la piqûre. Pas de liquéfaction.

Pomme de terre. — Pas de développement apparent.

Albumine de l'œuf. — Sakaroff a recommandé, pour remplacer le sérum du sang, l'albumine de l'œuf coagulée par la chaleur. Au procédé donné par Sakaroff pour la préparation des tubes de blanc d'œuf, nous préférons celui indiqué page 55 (B).

L'ensemencement en surface donne, au bout de vingt-quatre heures, de petites colonies rondes à surface convexe, mates, peu transparentes, moins blanches que le fond ; parfois, vers le douzième jour, leur couleur tourne au jaune rougeâtre ou prend des teintes chair.

Lait. — Développement abondant, sans coagulation.

Article III. — RECHERCHE ET DIAGNOSTIC.

Le diagnostic de la diphtérie étant souvent impossible par les seules ressources de la clinique, on demande à la bactériologie le diagnostic précis de toutes les angines et particulièrement des angines pseudo-membraneuses.

Ce diagnostic comporte deux ordres de recherches : on doit d'abord déterminer si l'angine ou le croup observés relèvent du

Bacille de la diphtérie pur ou associé, puis, en cas de résultat positif, étudier la virulence du bacille isolé. Cette seconde partie de la recherche n'est pas indispensable dans la pratique; en règle générale, on considère comme plus virulents les bacilles à formes allongées; d'ailleurs, au point de vue du traitement, la seule constatation de la nature diphtéritique exige le traitement sérothérapique.

En présence d'une angine, pour obtenir un diagnostic bactériologique complet, on aura recours à l'*examen microscopique* des frottis, aux *cultures* et aux *inoculations*. En pratique, l'examen microscopique et la culture suffisent ; le diagnostic réduit à ces deux opérations demande un maximum de vingt-quatre heures.

Prélèvement de l'exsudat. — Détacher la fausse membrane à l'aide d'un petit tampon d'ouate hydrophile fixé sur une pince à forcipressure ; quand la fausse membrane est très adhérente, on la saisit directement entre les mors de la pince ; quand il n'existe pas de fausses membranes, on racle légèrement la surface des amygdales ou du pharynx avec une petite spatule de platine ou de nickel.

Avant d'utiliser les fausses membranes recueillies, on les comprime très légèrement entre deux doubles de papier filtre stérilisé pour les débarrasser du mucus qui se trouve à leur surface.

Quand on veut expédier à un laboratoire éloigné un fragment de fausse membrane, on le dépose dans un petit tube stérilisé bouché à l'ouate ou on l'enveloppe dans un morceau de taffetas gommé que l'on place dans un tube de verre neuf et soigneusement bouché; les règlements exigent que, pour les transports par la poste, ce tube soit inclus dans une enveloppe métallique contenue elle-même dans une boîte en bois; sur l'étiquette qui porte l'adresse on doit faire mention du contenu du paquet.

A. **Examen microscopique.** — Avec une parcelle de l'exsudat préparer des frottis ; de ces frottis, les uns seront soumis à la simple coloration, les autres à la méthode de Gram :

1° Colorer au bleu de Roux, laver, sécher. Examiner avec l'objectif à immersion homogène.

2° Si l'examen précédent a révélé l'existence de bacilles, pour pousser plus loin le diagnostic, on colorera un frottis par la méthode de Gram : le Bacille de Löffler reste coloré et on pourra éliminer de cette façon un certain nombre de bacilles que l'on trouve fréquemment dans la bouche et qui ne prennent pas le Gram.

Mais si l'examen microscopique reste négatif, il faut savoir qu'il est parfois difficile de reconnaître le Bacille diphtérique au milieu d'un grand nombre d'autres microbes, et que lorsqu'on ne le trouve pas, on n'est pas autorisé à nier la diphtérie (Martin). *Il faut en tous cas pratiquer des ensemencements.*

Au point de vue du pronostic, on tire des renseignements précieux de l'examen microscopique : la présence de bacilles longs indique une forme sévère ; il en est de même de l'association avec le Streptocoque ; la présence du coccus Brisou caractérise d'ordinaire les formes bénignes.

Coupes. — Après durcissement à l'alcool et inclusion dans la paraffine, on pratique des coupes perpendiculaires à la surface de la membrane ; la méthode de Gram avec double coloration donne de fort belles préparations.

Dans ces coupes, on note la présence de trois couches : la couche sus-jacente au derme est formée par un lacis fibrineux dont les mailles contiennent des cellules épithéliales et des leucocytes ; au-dessus, une zone moyenne est constituée par de la fibrine granuleuse et contient peu d'éléments cellulaires ; enfin, la couche superficielle est presque entièrement constituée par les microbes ; les bacilles y sont disposés en amas dans lesquels ils sont placés parallèlement les uns aux autres ; les formes en cornichons abondent ; à côté des Bacilles diphtériques peuvent se trouver des microbes associés.

B. **Cultures.** — Les ensemencements doivent être pratiqués sur le sérum coagulé ou, à son défaut seulement, sur le blanc d'œuf.

Les différents milieux au sérum de Löffler, Tochtermann, Joos, etc., n'ont aucun avantage sur le sérum coagulé et compliquent inutilement la technique.

On prend avec une öse forte de platine une parcelle de fausse membrane ; on porte l'öse dans le tube de sérum et on ensemence par frottement sur toute la surface du sérum ; on ensemence de la même façon deux autres tubes *sans recharger l'öse* (*Techn.*, p. 89). Quand il n'existe pas de fausses membranes, on pratique l'ensemencement en frottant sur le sérum la spatule avec laquelle on vient de racler la surface des amygdales ou du pharynx.

Les tubes sont placés à l'étuve à 37°, et doivent être examinés dès la vingtième ou vingt-quatrième heure ; dès ce moment, on reconnaît facilement les colonies du Bacille diphtérique ; il faut savoir que certains coccus donnent des colonies assez analogues, quoique plus humides et plus homogènes ; aussi ne devra-t-on pas se contenter de l'examen microscopique, mais examiner au microscope les microbes constituant les colonies. Si l'on attendait plus de vingt-quatre heures avant d'examiner les tubes, l'observation pourrait être gênée par le développement des microbes associés ou existant dans la membrane à l'état d'impuretés. Parmi les trois tubes ensemencés, on choisira pour l'examen celui où les colonies seront le mieux isolées.

Porter le diagnostic de diphtérie toutes les fois que l'exsudat ensemencé sur sérum donne en vingt-quatre heures de nombreuses colonies de bacilles présentant l'aspect et les réactions colorantes du Bacille de Klebs-Löffler.

C. **Inoculations.** — Quand on veut obtenir des résultats rigoureux, on doit éprouver par les inoculations *plusieurs* des colonies diphtériques obtenues, une même fausse membrane pouvant contenir des bacilles de virulence différente.

On opère, pour chaque colonie, de la façon suivante : prélever purement une parcelle de la colonie et l'ensemencer en bouillon; au bout de vingt-quatre heures ensemencer un centimètre cube de la culture sous la peau d'un cobaye adulte ; l'animal meurt plus ou moins rapidement suivant la virulence du bacille (Voy. p. 381). En cas d'échec, essayer de même la virulence chez un petit oiseau.

Article IV. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Vitalité. — Le Bacille de la diphtérie se conserve très longtemps vivant dans les cultures; les réensemencements sont fertiles même après cinq et six mois.

Pris dans une culture, à l'état humide, le bacille est très sensible à l'action des agents destructeurs. Les cultures en bouillon sont stérilisées en quelques minutes par une température de + 58°.

Les bacilles desséchés résistent mieux à la chaleur, et peuvent rester vivants après une exposition de plusieurs minutes à 95°.

La résistance du Bacille de Klebs-Löffler est encore beaucoup plus grande dans les fausses membranes. Une fausse membrane desséchée et exposée pendant une heure à une température de 95°-100° peut encore donner des ensemencements fertiles.

La dessiccation dans les milieux albumineux altère très peu la virulence du Bacille diphtérique, une fausse membrane desséchée par Roux et Yersin et conservée à l'abri de la lumière à la température de la chambre donna encore des cultures après trois et cinq mois. Les bacilles provenant d'une culture sur sérum résistent moins à la dessiccation, surtout quand celle-ci est rapide.

L'exposition à la lumière des fausses membranes desséchées amène assez rapidement la mort du bacille ; une fausse membrane desséchée, conservée à l'air et au soleil par Roux et Yersin, ne contenait plus de bacilles vivants après un mois et demi. Une culture sur sérum desséchée et étalée en couche mince a été trouvée stérile

après une exposition de vingt-quatre heures à la lumière diffuse (Ledoux-Lebard).

Les antiseptiques détruisent rapidement le Bacille de Klebs-Löffler dans les cultures; l'acide phénique à 1 p. 100, le bichromate à 2 p. 100 stérilisent instantanément celles-ci ; etc.

Quand on immerge des fils de soie dans une culture du Bacille de la diphtérie, puis qu'on les dessèche, le bacille, sur ces fils desséchés, se montre moins sensible aux antiseptiques : il résiste plusieurs minutes à l'acide phénique et au perchlorure de fer à 1 p. 100, à l'acide salicylique en solution alcoolique à 5 p. 100, etc. (Chantemesse et Vidal). Dans les fausses membranes desséchées, la résistance du bacille aux antiseptiques est encore plus grande.

Virulence. — Pour juger de la virulence d'un Bacille diphtérique, il faut le soumettre à l'épreuve suivante :

On fait une culture en bouillon et au bout de vingt-quatre à trente heures on en inocule un centimètre cube sous la peau d'un cobaye adulte pesant 400 à 500 grammes. Plusieurs cas peuvent se présenter :

a. Si le bacille est très virulent, l'animal succombe en vingt-quatre ou trente heures.

b. Si le bacille est moyennement virulent, l'animal succombe en deux à six jours.

c. Si le bacille est peu virulent, l'animal succombe en huit à dix jours.

d. Si le bacille est très peu virulent, l'animal ne succombe pas ; il se produit un œdème suivi d'une escarre.

e. Enfin, si aucune lésion ne se produit, la virulence est nulle.

La virulence du bacille retiré des fausses membranes est très variable ; dans les diphtéries graves, les bacilles virulents sont très nombreux ; dans les diphtéries bénignes, on rencontre à côté de quelques colonies actives un grand nombre de colonies constituées par des bacilles non virulents. Dans la bouche des personnes saines, on trouve fréquemment, comme nous l'avons dit plus haut, un bacille non virulent ; ce bacille, que l'on peut rencontrer aussi dans des angines non diphtéritiques, a été désigné par Löffler sous le nom de *pseudo-diphtérique*; Löffler, G. Hoffmann, etc., différencient absolument ce bacille du véritable Bacille diphtérique, mais Roux et Yersin ont insisté sur les motifs qui permettent d'identifier les deux bacilles; le Bacille pseudo-diphtérique n'est que le Bacille de Klebs-Löffler dépourvu de virulence.

Discussion. — Les deux bacilles présentent des différences morphologiques insignifiantes. Le Bacille pseudo-diphtérique est en général plus court que le Bacille de Klebs-Löffler, mais nous savons depuis les observations de

Martin que la longueur du bacille légitime varie beaucoup et que, d'ordinaire, cette longueur permet de juger de sa virulence.

Le Bacille pseudo-diphtérique ne détermine jamais la mort du cobaye, mais il provoque parfois chez cet animal de l'œdème au point d'inoculation. Cependant un bacille qui ne tue pas le cobaye peut tuer les petits oiseaux; or Roux et Yersin, prenant un tel bacille donnant de l'œdème au cobaye, ont pu remonter sa virulence en l'asssociant au Streptocoque. *La virulence n'est pas un caractère fixe.*

On pourrait faire cette objection à l'identification des deux bacilles, que l'on n'est pas encore parvenu à rendre actif un Bacille pseudodiphtérique dépourvu de toute virulence. Cette objection tombe devant une observation de Roux et Yersin : des bacilles virulents chez un malade atteint de diphtérie deviennent parfois moins virulents pendant la convalescence et finissent par être complètement inactifs ; or, on ne peut restituer leur virulence à ces bacilles légitimes devenus avirulents.

Martin a prouvé que certains bacilles courts ne tuant pas le cobaye sont des Bacilles diphtériques dégénérés (1). Bien plus, dans un milieu de culture favorable, des bacilles non virulents pour le cobaye donnent fréquemment de la toxine neutralisable par le sérum antidiphtérique.

Atténuation. — Dans les vieilles cultures, le Bacille de la diphtérie perd beaucoup de sa virulence, mais un réensemencement en bouillon lui rend d'ordinaire toute son activité.

Il n'en est plus de même quand on cultive un bacille virulent sur la gélose glycérinée, ou en bouillon, dans un ballon de Fernbach, en présence d'un courant d'air à 39°. Dans ces conditions, le bacille perd rapidement et d'une façon définitive sa virulence et ne produit plus que de l'œdème quand on l'inocule au cobaye (Roux et Yersin).

Le même phénomène se produit quand on conserve au contact de l'air une fausse membrane diphtéritique desséchée ; les bacilles y gardent longtemps leur vitalité ; mais, dans les cultures obtenues par des ensemencements répétés de parcelles de cette fausse membrane, on voit chaque jour croître le nombre des colonies de bacilles non virulents. Les bacilles ainsi atténués artificiellement prennent tous les caractères du Bacille pseudo-diphtérique.

Restitution et exaltation de la virulence. — On ne peut restituer sa virulence à un bacille atténué au point d'être sans action sur le cobaye (Roux et Yersin).

(1) *Expérience de Martin.* — Une culture en bouillon d'un bacille long, très actif, a été réensemencée en bouillon au bout de huit mois ; le bouillon est resté stérile; au contraire, un ensemencement sur gélose recouverte de bouillon de veau récemment préparé a donné une culture de bacille court. Ce bacille est resté court dans les cultures suivantes ; il ne tue pas le cobaye, mais lui donne de l'œdème ; dans la sérosité de l'œdème on retrouve du bacille court.

Ce bacille court artificiellement obtenu tue le moineau : or si on inocule un moineau neuf et un moineau ayant reçu du sérum antidiphtérique, avec 1/10 de centimètre cube de culture en bouillon de ce bacille, le témoin meurt, le moineau-sérum résiste. On se trouve donc en présence d'un bacille court, non virulent pour le cobaye et sûrement diphtérique.

Au contraire, Roux et Yersin ont pu exalter le bacille très peu virulent, donnant un léger œdème au cobaye : ils inoculent ce bacille mélangé à une culture virulente de Streptocoque ; le cobaye succombe avec des symptômes de diphtérie et la virulence du bacille retiré de la sérosité de l'œdème est notablement accrue.

D'après Blasi et Russo-Travalli, l'association avec le Colibacille exalte aussi la virulence du Bacille de Klebs-Löffler.

Trumpp a restitué leur virulence à des bacilles à peu près inactifs en les inoculant en même temps qu'une petite dose de toxine diphtérique.

Les passages en série chez le cobaye et le lapin n'exaltent pas la virulence du Bacille de la diphtérie (Roux et Yersin). Bardach, en faisant des passages successifs chez le chien, a obtenu, au bout du vingt-cinquième passage, une exaltation de la virulence, exaltation manifeste pour le chien, mais très légère pour le cobaye.

En pratiquant des cultures en série dans des tubes de collodion en péritoine de lapin, Martin a exalté la virulence pour cet animal ; la virulence pour le cobaye n'est pas modifiée.

§ 2. — TOXINE.

Roux et Yersin ont démontré que la diphtérie est une intoxication produite par le poison très actif fabriqué par le bacille ; ils ont mis en évidence la présence de ce poison dans les cultures en bouillon du Bacille de Klebs-Löffler.

Les premières recherches de Roux et Yersin n'avaient abouti qu'à la production d'une toxine peu active tuant le cobaye à la dose de 30 centimètres cubes ; aujourd'hui Martin prépare une toxine tuant le cobaye adulte à la dose de 1/200e et même 1/500e de centimètre cube.

PREPARATION DE LA TOXINE.

Conditions de formation. — La toxine est obtenue en cultivant un bacille virulent au contact de l'air.

A. — Le bacille employé doit avoir subi l'épreuve de l'inoculation : un bacille favorable tue le cobaye de 300-400 grammes en vingt-quatre ou trente-six heures, à la dose d'un centimètre cube de culture en bouillon injecté sous la peau. Un bacille très virulent peut ne pas produire une toxine active, aussi est-il bon de commencer par éprouver le pouvoir toxigène du bacille qu'on se propose d'employer pour la production en grand de la toxine.

Pour conserver un Bacille diphtérique toxigène, on l'ensemence dans des

tubes de bouillon de Martin. Après séjour d'une semaine à l'étuve à 33°-35°, les tubes sont retirés de l'étuve et placés à l'abri de la lumière. Les vieilles cultures ainsi conservées, rajeunies par deux ensemencements successifs, donnent un bacille très toxigène.

B. — La production de la toxine est liée à la *composition* et surtout à la *réaction* du milieu de culture.

Nous avons dit que, sous l'influence du développement du Bacille diphtérique, le bouillon primitivement alcalin devient acide pendant les premiers jours de la culture, puis redevient alcalin par la suite. La toxine se forme au moment où l'acidité diminue, son activité augmente en même temps que l'alcalinité du milieu, et d'autant plus vite que le bouillon devient plus rapidement alcalin ; quand on empêche l'acidité de se produire, la toxine se forme plus rapidement et en plus grande quantité.

Aussi a-t-on cherché le moyen de diminuer ou de supprimer la période d'acidité ; plusieurs solutions ont été proposées. Roux, Yersin et Martin ont diminué la durée de la période d'acidité en faisant la culture en présence d'un courant d'air ; leur procédé a longtemps été employé pour la préparation en grand des toxines.

Les sucres (glucose, lévulose, saccharose, glycérine, galactose) favorisant la production de l'acidité, de nombreux savants ont cherché à les éliminer dans les milieux de culture : Nicolle a obtenu une bonne toxine en employant de la viande fraîche où le glycogène n'est pas encore transformé en glucose (le glycogène ne favorise pas l'acidité) ; Spronck, au contraire, a proposé l'emploi de viande fermentée dans laquelle les sucres ont disparu ; Park et Williams ont cultivé le bacille dans du bouillon préalablement alcalinisé par la soude; Macé, dans du bouillon additionné de carbonate de chaux.

Tous ces procédés sont inférieurs au mode de culture indiqué par Martin ; cet auteur a trouvé un milieu dans lequel la période acide ne se produit pas et qui donne des cultures extrêmement toxiques.

Procédé de Roux et Martin. — La culture est faite en présence d'un courant d'air. Pour cela on utilise des ballons de Fernbach légèrement modifiés (fig. 197). Chaque ballon reçoit 400 à 500 centimètres cubes de bouillon de veau qui ne doivent former qu'une couche de 2 à 3 centimètres d'épaisseur. On place un bouchon d'ouate dans la tubulure latérale D. Le ballon est stérilisé à l'autoclave ; après refroidissement, on ensemence par la tubulure supérieure et on porte à l'étuve à 37°.

Lorsque le développement est bien commencé, que le bouillon est trouble, c'est-à-dire vers la vingt-quatrième heure, on organise le dispositif permettant de faire passer un courant d'air à la surface de

la culture. Pour cela, on place sur la tubulure supérieure, au-dessus du tampon d'ouate, un bouchon de caoutchouc portant un tube qui relie le ballon à un flacon barboteur A contenant un peu d'eau; d'autre part, on relie, par un tube de caoutchouc, la tubulure latérale D à la trompe à eau; dès que celle-ci est mise en fonctionnement, l'air appelé dans le ballon traverse le flacon barboteur, s'y humidifie et vient lécher la surface de la culture; avec une pince de Mohr

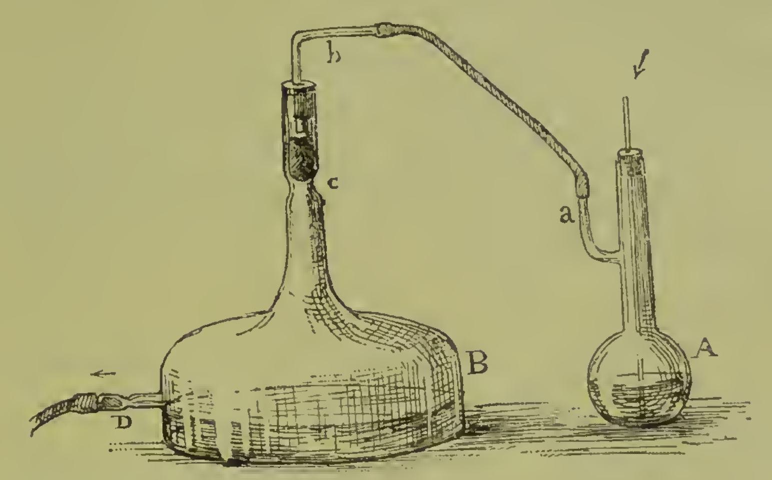


Fig. 197. — Dispositif pour la préparation de la toxine diphtérique.

placée sur le tube qui relie le ballon au barboteur, on règle aisément le débit du courant d'air de sorte que les bulles crèvent continuellement mais non tumultueusement à la surface du liquide du barboteur (1).

Pour préparer de grandes quantités de toxine, on dispose plusieurs ballons identiques; il serait simple de relier la tubulure supérieure du premier ballon à la tubulure latérale du second, dont la tubulure supérieure elle-même serait reliée à la tubulure latérale du troisième, etc., la tubulure latérale du premier ballon étant reliée à la trompe. Mais l'expérience montre qu'il est préférable d'utiliser une rampe de cuivre reliée à la trompe et portant autant d'ajutages qu'il existe de ballons. Chaque système constitué par un ballon et son barboteur est relié à un des ajutages.

Au bout de trois à quatre semaines, la culture est suffisamment riche en toxine; sur le fond des vases, on voit un dépôt de microbes et à la surface un voile formé par les bacilles plus jeunes; la réaction est fortement alcaline.

La culture doit alors être filtrée sur la bougie Chamberland; cette filtration sera opérée à l'aide d'un des dispositifs décrits pages 19 et 21. Le filtrat tue le cobaye adulte à la dose de 1/10e de centimètre cube.

(1) Il est indispensable de disposer un barboteur pour humidifier le courant d'air, sans quoi le bouillon de culture s'évaporerait rapidement.

Procédé de Martin. — Ce procédé supprime l'obligation du courant d'air et par conséquent tout appareillage compliqué; il est plus expéditif que le précédent et donne une toxine plus active, tuant le cobaye à la dose de 1/200e de centimètre cube.

Martin emploie le bouillon de veau peptonisé (*Bouillon peptonisé de Martin* : Voy. p. 31) stérilisé par filtration (1) et réparti dans de larges ballons. Le bacille s'habitue très vite à ce milieu, s'y régénère et y produit une toxine active.

Caractères de la culture. — Vers la vingt-quatrième heure il se forme un voile qui, dès le deuxième jour, est continu et épais. *Rejeter tout microbe qui ne donne pas de voile.* Quand la culture marche bien, le voile tombe au fond par lambeaux le troisième jour; un nouveau voile remplace le premier, s'immerge vers le sixième jour, puis il ne s'en reforme plus. Le milieu n'est jamais acide au tournesol; du deuxième au quatrième jour il devient alcalin à la phtalléine.

Le maximum de toxicité se produit vers le cinquième ou septième jour; puis l'activité de la toxine n'augmente plus et diminue vers le dixième jour. C'est donc vers la fin de la première semaine qu'il convient d'opérer la filtration.

Procédés divers. — Les procédés de Spronck, Park et Williams, Nicolle, Macé, employés dans quelques laboratoires, sont moins fidèles que les précédents.

Premier procédé de Spronck. — Basé sur la disparition du glucose dans la viande vieillie (2).

Avec de la viande conservée pendant plusieurs jours jusqu'à ce qu'elle prenne une légère odeur, on prépare selon les règles ordinaires un bouillon peptonisé à 2 p. 100; après alcalinisation, on ajoute 0,5 p. 100 de chlorure de sodium et un peu de carbonate de chaux. Le bouillon est versé dans des flacons de 500 grammes que l'on emplit aux trois quarts; après stérilisation et refroidissement, on pratique l'ensemencement. Les cultures sont filtrées après un séjour de trois à quatre semaines à l'étuve à 37°.

Second procédé de Spronck. — Basé sur le fait que la levure aurait une action favorisante sur la production de toxine.

Ensemencer dans l'*eau de levure peptonisée* (Voy. p. 36) le bacille toxigène rajeuni par une culture sur sérum coagulé suivie d'un passage dans un tube d'eau de levure peptonisée. La culture doit être faite dans un large matras, en couche peu épaisse; dès la vingt-quatrième heure apparaît un voile continu; à la fin de la première semaine la culture a atteint son maximum de toxicité. Elle tue le cobaye à la dose de 1/200e de centimètre cube.

(1) Le bouillon de Martin stérilisé à 120° donne de moins bons résultats; à défaut de bouillon filtré sur porcelaine, il vaut mieux employer le milieu stérilisé par trois chauffages à 100°.

(2) Roux a montré que l'on obtenait des résultats plus constants en ajoutant de la levure à la macération de viande; dans la préparation de son bouillon, Martin a supprimé l'addition de levure et est arrivé à de bons résultats par le séjour de la macération à l'étuve à 35° pendant vingt heures.

Spronck ne filtre pas sur porcelaine, il ajoute à la culture 3 grammes d'acide phénique par litre et filtre sur papier.

Procédé de Nicolle. — De la *viande de bœuf tué le matin même* est hachée et mise à macérer une heure à 10° ou 12° dans le double de son poids d'eau. La macération, additionnée de 2 p. 100 de peptone et de 0,5 p. 100 de sel marin, est portée à l'ébullition, filtrée, alcalinisée « assez fortement » et portée dix minutes à 120°, puis filtrée de nouveau et répartie dans des vases quelconques, que l'on bouche à l'ouate et stérilise quinze minutes à 115°. Après sept jours d'exposition à l'étuve à 37°, sans courant d'air, la culture filtrée serait aussi active que la toxine obtenue par Roux et Martin.

Procédé de Macé. — Macé a recommandé l'emploi de bouillon peptonisé ordinaire additionné de 10 p. 100 de carbonate de chaux, réparti dans des ballons de 1 à 2 litres et stérilisé à l'autoclave. Après un séjour de quatre à six semaines à 37°, les cultures dans ce bouillon fourniraient une toxine aussi active que celle de Roux et Martin.

Procédé de Park et Williams. — Ces auteurs emploient un milieu largement alcalinisé : c'est le bouillon peptonisé ordinaire additionné, après neutralisation, de 7 centimètres cubes de solution normale de soude par litre (Voy. p. 29).

ESSAI ET CONSERVATION DE LA TOXINE.

Essai. — L'activité de la toxine n'est pas toujours la même dans des cultures faites avec le même bacille, dans des conditions en apparence identiques; aussi faut-il toujours éprouver l'activité de la toxine que l'on a obtenue.

L'épreuve se fait en inoculant sous la peau d'un cobaye de 400 à 500 grammes un dixième de centimètre cube de toxine : dans ces conditions, un produit actif, susceptible d'être employé pour l'immunisation des animaux destinés à fournir du sérum thérapeutique, doit tuer le cobaye en quarante-huit heures et moins.

Pour la mensuration des petites doses de toxine on fait une dilution de la toxine dans l'eau stérile : 1 centimètre cube d'une dilution au dixième, par exemple, représente 0,1 centimètre cube de toxine.

Conservation. — La toxine doit être conservée dans des vases stériles, bien bouchés, exactement remplis et tenus à l'abri de la lumière ; elle perd très lentement son activité dans ces conditions.

ACTION SUR LES ANIMAUX.

La toxine diphtérique injectée aux animaux sensibles produit chez eux une maladie identique à celle que cause l'inoculation des cultures vivantes.

La toxine peut être injectée sous la peau, dans les veines, dans le cerveau ou dans le péritoine ; elle ne produit pas d'effet quand on la fait ingérer.

Cobaye. — Après injection sous-cutanée d'une fraction de centi-

mètre cube de toxine (un dixième à un quart suivant l'activité) il se produit rapidement de l'œdème au point d'inoculation, bientôt l'animal a la respiration haletante et le poil hérissé, et la mort arrive de la vingtième à la cinquantième heure. A l'autopsie on trouve les lésions que nous avons signalées à propos de la diphtérie expérimentale. Des doses moindres de toxine active (1/500e à 1/10e de centimètre cube) tuent le cobaye en quelques jours.

Lapin. — L'injection sous-cutanée ou intraveineuse de un quart à un demi-centimètre cube amène la mort avec les lésions ordinaires ; si la dose injectée est assez faible pour ne pas entraîner la mort rapide, on observe le développement de paralysies diphtéritiques typiques et la mort survient au bout de plusieurs jours par cachexie.

L'application de toxine sur les muqueuses, même sans excoriation préalable, produit des lésions locales et parfois de véritables fausses membranes (Roger et Bayeux, Morax et Elmassian).

Chien. — L'inoculation sous-cutanée d'un quart de centimètre cube de toxine produit, chez le chien, de l'ictère et des paralysies progressives. La mort peut terminer la scène, cependant la guérison survient assez souvent, les paralysies disparaissent peu à peu et tout rentre dans l'ordre.

Une dose de 1 centimètre cube tue le chien en quelques heures; on observe alors de l'ictère et une diarrhée profuse ; à l'autopsie, le foie est dur, cirrhotique.

Oiseaux. — La poule, le pigeon et les petits oiseaux succombent rapidement à l'inoculation sous la peau ou dans le muscle pectoral d'une quantité minime de toxine.

Ruminants. — Les chèvres sont très sensibles à la toxine ; elles succombent rapidement à l'inoculation de 2 à 3 centimètres cubes : il en est de même des vaches qui succombent souvent à l'inoculation de 5 centimètres cubes ; le mouton est un peu plus résistant.

Équidés. — Le cheval supporte mieux la toxine que les espèces précédentes ; souvent l'inoculation sous-cutanée de 2 à 5 centimètres cubes de toxine très active ne provoque qu'une fièvre passagère et un peu d'œdème local. L'âne est plus sensible.

Rats, souris. — Ils sont à peu près insensibles à la toxine *injectée sous la peau* ; pour tuer une souris, il faut injecter autant de toxine que pour tuer quatre-vingts à cent cobayes (Roux et Yersin).

Au contraire, l'*injection intracérébrale* de un dixième de centimètre cube de toxine tue le rat avec des symptômes de paralysie diphtéritique (Roux et Borrel).

Le cerveau du rat est donc sensible à la toxine, et si l'animal ne meurt pas après l'injection sous-cutanée de grandes quantités du poison, c'est que

ce poison n'arrive pas à l'encéphale, retenu qu'il est par certaines cellules de l'organisme (probablement les phagocytes).

NATURE ET PROPRIÉTÉS DU POISON.

La détermination de la nature du poison diphtérique a donné lieu à de nombreuses recherches ; Brieger et Fränkel, Wasserman et Proskauer ont voulu en faire une toxalbumine, Gamaleia une nucléoalbumine ; mais ces auteurs ne sont arrivés qu'à obtenir des produits très impurs, relativement très peu toxiques.

Roux et Yersin ont démontré que le principe actif des cultures filtrées est une substance analogue aux diastases et en présentant les propriétés capitales.

Le poison diphtérique est tué à 100° ; une exposition de douze heures à 58° affaiblit son activité au point qu'un centimètre cube de toxine ainsi chauffée ne tue plus le cobaye ; après chauffage à 70°, l'affaiblissement est encore plus marqué : l'inoculation de plusieurs centimètres cubes amène chez le cobaye une maladie chronique se terminant par la mort au bout de plusieurs semaines.

Comme les diastases, le poison diphtérique a la propriété d'être entraîné par les précipités que l'on produit dans les liquides où il est dissous (*Réaction de Miahle*).

En ajoutant goutte à goutte à de la toxine une solution de chlorure de calcium, il se produit, grâce aux phosphates contenus dans le liquide, un précipité de phosphate de chaux ; ce précipité, recueilli sur un filtre et lavé, est très toxique ; quand on en inocule un grain sous la peau d'un cobaye, l'animal succombe rapidement ; au point d'inoculation, il se produit de l'œdème et une petite fausse membrane grisâtre. Ce précipité est plus actif à l'état humide qu'à l'état sec ; cependant il garde, après dessiccation, une grande partie de son activité et résiste alors beaucoup mieux à l'action de la chaleur : il peut être chauffé à 70°, sans que sa toxicité soit diminuée ; un petit grain du précipité desséché, placé sous la peau, peut tuer successivement trois cobayes, lorsqu'on le reporte d'un animal sur un autre.

Après une première précipitation, le liquide clair garde encore une certaine toxicité, mais on peut le précipiter plusieurs fois de suite et chaque fois le précipité entraîne une nouvelle quantité, progressivement décroissante, de poison ; enfin le liquide précipité plusieurs fois et devenu très peu actif peut encore donner au cobaye, à haute dose, une intoxication chronique.

Le poison diphtérique, soluble dans l'eau, est précipité par l'alcool, comme les diastases ; mais ce traitement diminue son activité. Pour obtenir la précipitation, il est avantageux de concentrer d'abord le filtrat au dixième de son volume dans le vide à 25° ; à l'extrait liquide obtenu, on ajoute quatre à cinq volumes d'alcool fort, le précipité produit contient le poison mélangé à de nombreuses impuretés.

La toxine obtenue par filtration peut être desséchée dans le vide jusqu'à consistance d'extrait sec ; cet extrait est soluble dans l'eau ; il renferme le poison mélangé à une énorme proportion d'impuretés; la solution aqueuse soumise à la dialyse abandonne rapidement les sels minéraux qu'elle contient, mais ne se dépouille que très difficilement de la toxine ; ce procédé peut être employé pour purifier le poison diphtérique.

La puissance toxique du poison diphtérique est considérable.

Un centimètre cube de culture filtrée fournit un centigramme de résidu sec ; or, 1/200e de centimètre cube de culture filtrée est suffisant pour tuer un cobaye ; la dose toxique de résidu sec est donc $\frac{0,01}{200}$, soit 0gr,00005 ; de ces 5 centièmes de milligramme, il faut défalquer la plus plus grande part, relevant des sels minéraux, peptone, etc. ; on conçoit combien est infinitésimale la dose toxique.

Le poison diphtérique est sensible à l'action de certains agents chimiques. Les ferments pepsiques le détruisent ; l'alcool en atténue l'activité. Les agents oxydants se font remarquer par l'énergie avec laquelle ils le modifient : l'eau oxygénée, les hypochlorites alcalins, mais surtout le trichlorure d'iode et l'iode affaiblissent considérablement son activité ; l'action de ces corps a été utilisée pour atténuer la toxine destinée à servir aux immunisations.

§ 3. — VACCINATION.

I. — Chez les *animaux de laboratoire*, les injections espacées de doses très faibles de toxine arrivent difficilement à produire l'accoutumance ; il se produit une accumulation des doses, l'animal se cachectise et meurt.

a. G. Hoffmann a obtenu le premier l'immunisation des cobayes : les animaux inoculés avec des cultures atténuées par le vieillissement supportaient ensuite l'inoculation de cultures pleinement virulentes.

b. Fränkel parvint à immuniser des cobayes en leur injectant sous la peau des cultures diphtéritiques chauffées à 65°-70° pendant une heure ; il injectait en plusieurs fois 10 à 20 centimètres cubes de ces cultures : l'immunité était acquise au bout de quatorze jours.

c. Behring arrive à immuniser des cobayes et des lapins en injectant de la sérosité pleurale provenant de cobayes ayant succombé à l'inoculation des cultures virulentes ; l'immunisation est obtenue quatorze ou quinze jours après l'inoculation vaccinale. Ce procédé donne des résultats très inconstants.

d. Behring immunise des cobayes et des moutons par l'inoculation de cultures âgées de trois semaines additionnées de 1 p. 500 de trichlorure d'iode; après une injection de quelques centimètres cubes du mélange, l'animal est laissé au repos pendant une dizaine de jours, puis reçoit une seconde injection de culture additionnée d'une quantité moins forte de trichlorure d'iode ; au bout d'une quinzaine de jours, l'immunité est acquise. Ce procédé échoue chez le lapin.

Dans certains cas, Behring a pu exercer une action thérapeutique en injectant du trichlorure d'iode quelques heures après avoir inoculé au cobaye une culture virulente du Bacille de Klebs-Löffler.

Bien plus, des animaux qui avaient reçu quelques jours auparavant une injection sous-cutanée d'une solution au dixième d'eau oxygénée ont résisté à l'inoculation de la culture virulente.

e. Brieger, Wassermann et Kitasato ont conféré l'immunité au cobaye en lui injectant une culture en bouillon de thymus chauffée quinze minutes à 70°. — Nous reproduirons l'immunisation d'un cobaye d'après ces auteurs.

Le bouillon de thymus préparé selon le procédé indiqué page 33 est ensemencé avec un bacille très virulent (le bacille employé par les auteurs tuait en quarante-huit heures un cobaye à la dose de $0^{cc},05$ de culture en bouillon). Quand la culture est complètement développée, on la chauffe pendant quinze minutes à 70°.

Un cobaye de 330 grammes a reçu le 5 octobre 2 cent. cub. de culture chauffée.
— — le 7 — 2 —
— — le 11 — 2 —

On lui inocule le 20, ainsi qu'à deux animaux de contrôle, un centimètre cube d'une culture en bouillon, tuant à $0^{cc},05$.

Les deux cobayes témoins meurent en trente-six heures, le cobaye traité reste vivant. Il a présenté au point d'inoculation un œdème assez volumineux, puis il s'est formé une escarre nécrotique qui s'est éliminée par la suite : le Bacille diphtérique a cultivé sur place, mais l'organisme du cobaye était préservé contre le poison.

Les auteurs ont immunisé ainsi soixante-dix cobayes ; néanmoins Behring et Kitasato ont démontré par la suite que cette méthode était inférieure à l'emploi du trichlorure d'iode.

II. — Roux, Nocard et Martin sont parvenus à immuniser divers animaux (lapins, moutons, chèvres, vaches, chevaux) en leur inoculant d'abord de la toxine active mélangée à de la solution iodée de Gram, puis des doses progressives de toxine pure.

Un *lapin*, par exemple, reçoit d'abord sous la peau un demi-centimètre cube du mélange suivant, préparé au moment de l'emploi :

Toxine	2 volumes.
Solution iodée de Gram	1 volume.

Au bout de quelques jours on renouvelle l'injection et on continue ainsi pendant quelques semaines; alors on diminue la proportion d'iode et on arrive progressivement à donner de la toxine pure. Il est nécessaire de peser fréquemment les animaux et d'interrompre les injections quand ils diminuent de poids, sans quoi on déterminerait la cachexie et la mort.

La *chèvre* et la *vache* s'immunisent de même, mais sont très sensibles au poison; il est nécessaire de donner des doses très faibles de toxine iodée au début et de ne passer à la toxine pure que lorsque le sang possède un certain degré de pouvoir antitoxique; il faut savoir qu'au moment de la mise-bas, la sensibilité au poison est augmentée.

Le *cheval* supporte bien la toxine ; c'est l'animal dont l'immunisation présente le plus d'intérêt, car on l'utilise comme producteur du sérum antitoxique.

Les chevaux choisis doivent être encore jeunes (six à neuf ans), bien se nourrir et ne présenter aucune lésion des organes internes. Après les avoir soumis à l'épreuve de la malléine pour s'assurer qu'ils ne sont pas morveux (Voy. *Morve*), on leur donne d'abord une petite quantité de toxine active additionnée ou non de liquide de Gram, puis les doses sont augmentées progressivement ; dès la troisième injection, on donne de la toxine pure ; la susceptibilité des différents individus variant beaucoup, on doit toujours commencer par des doses sûrement inoffensives pour éviter de déterminer une réaction violente qui compromettrait la marche régulière de l'immunisation. Les injections de toxine se pratiquent sous la peau de l'encolure ou en arrière de l'épaule.

Nous reproduisons comme type l'immunisation d'un cheval par Roux et Nocard :

Cheval de sept ans, du poids de 400 kilogrammes environ. La toxine employée tue un cobaye de 500 grammes en quarante-huit heures, à la dose de 1/10e de centimètre cube. Elle est injectée sous la peau de l'encolure ou en arrière de l'épaule.

1er jour de l'expérience.	Injection de	1/4 c. c.	Toxine iodée à 1 p. 10.	Pas de réaction ni locale ni générale.
2e —	—	1/2 c. c.	Toxine iodée à 1 p. 10.	
4e, 6e, 8e jour	—	—	—	
13e, 14e —	—	1 c. c.	—	Pas de réaction.
17e —	—	1/4 c. c.	Toxine pure.	Léger œdème, sans fièvre.
22e —	—	1 c. c.	—	—
23e —	—	2 c. c.	—	—
25e —	—	3 c. c.	—	—
28e —	—	5 c. c.	—	—
30e, 32e, 36e —	—	5 c. c.	—	—
39e, 41e —	—	10 c. c.	—	—
43e, 46e, 48e, 50e jour	—	30 c. c.	Toxine pure,	œdème assez prononcé dissipé en vingt-quatre heures.
53e jour.	—.	60 c. c.	—	—
57e, 63e, 65e, 67e jour	—	60 c. c.	—	—
72e jour	—	90 c. c.	—	—
80e —	—	250 c. c.	—	—

Ce cheval a reçu en deux mois et vingt jours 800 centimètres cubes de toxine sans présenter autre chose qu'un œdème local passager, de l'inappétence et une augmentation de température de 1° environ les soirs des jours où l'injection a été copieuse. Le quatre-vingt-septième jour, le cheval a été saigné, puis a reçu sans en être incommodé 200 centimètres cubes de toxine dans la jugulaire. Les chevaux vaccinés supportent également bien des doses massives (plusieurs centaines de centimètres cubes) de cultures vivantes.

Quelquefois les animaux manifestent une sensibilité plus grande au poison diphtérique; après l'injection, l'animal peut présenter un œdème dur, étendu, persistant plusieurs jours, et même des sueurs et une élévation notable de température.

Pour conduire rapidement l'immunisation, on peut commencer par des doses plus fortes que dans l'exemple que nous venons de citer : on injecte d'emblée un demi-centimètre cube de toxine pure; presque tous les chevaux résistent à cette dose, mais il est prudent de ne pas la renouveler avant huit jours. Avec les toxines hyperactives que l'on emploie aujourd'hui, l'immunisation doit être menée très prudemment.

Pour entretenir l'état d'immunisation des chevaux, il est nécessaire de leur donner de temps en temps de la toxine. On peut, tous les vingt jours, après avoir fait la saignée, injecter dans la jugulaire une dose de 300 à 500 centimètres cubes de culture ; mais il semble plus efficace d'injecter fréquemment sous la peau des doses modérées de toxine : on en donnera, par exemple, tous les deux ou trois jours 10 à 50 centimètres cubes; la saignée doit être pratiquée seulement trois semaines après la dernière injection.

§ 4. — SÉROTHÉRAPIE.

Behring et Kitasato, en 1890, ont mis en lumière les propriétés du sang des animaux immunisés contre la diphtérie.

Le sang de ces animaux est capable de détruire le poison diphtérique *in vitro* et dans l'organisme; cette propriété se retrouve intacte dans le sérum du sang débarrassé de tout élément cellulaire. Ce sérum se montre préventif et thérapeutique sur les lapins et les cobayes intoxiqués avec le poison diphtérique ou inoculés avec le microbe vivant. Ces faits établis, Behring, Ehrlich et leurs collaborateurs essayent d'appliquer les propriétés du sérum antidiphtérique au traitement de la diphtérie humaine (Behring, Ehrlich, Boer, Wassermann, Rossel).

Mais la sérothérapie de la diphtérie n'est entrée véritablement dans la pratique médicale qu'après la communication de Roux et Martin au Congrès d'hygiène de Buda-Pesth, dans laquelle ces auteurs résument les recherches qu'ils ont effectuées de 1891 à 1894.

Behring et Kitasato utilisaient le mouton et la chèvre comme producteurs de sérum ; après eux, Bardach et Aronson se sont adressés au chien. Depuis les recherches de Roux, Nocard et Martin, le cheval est seul employé ; nous exposerons la pratique suivie à l'Institut Pasteur.

Préparation du sérum. — L'animal de choix est le cheval, d'abord parce que son sérum, même à doses considérables, est inoffensif pour l'homme et les animaux de laboratoire (Roux et Vaillard) ; puis, cet animal supporte beaucoup mieux que les autres espèces la toxine diphtérique ; enfin il est capable de fournir de grandes quantités de sérum.

Le cheval destiné à produire le sérum doit être immunisé, avec les précautions que nous avons énoncées plus haut, par l'injection répétée de petites doses de toxines. Il faut environ trois mois pour que l'immunisation du cheval soit suffisante ; actuellement on injecte de la toxine progressivement jusqu'à ce que l'animal ait reçu un total d'un litre de toxine ; les dernières injections sont de 200 à 250 centimètres cubes ; on laisse reposer le sujet pendant trois semaines après la dernière injection avant de pratiquer la saignée. La saignée fournit environ 4 litres de sang ; elle peut être répétée tous les vingt ou trente jours.

L'immunisation du cheval producteur de sérum doit être entretenue par de nouvelles injections de toxine faites de temps en temps; nous avons dit qu'après la saignée, par la canule restant en place, on peut injecter en une fois dans la veine une dose de 300 à 500 centimètres cubes de toxine; on peut aussi avoir recours aux injections répétées de petites doses sous la peau (p. 393).

La saignée est pratiquée dans la jugulaire selon la technique exposée pages 48-51 (*Procédé de Nocard et appareil de Latapie*). Les 4 litres de sang fournissent près de 3 litres de sérum.

Quand on possède plusieurs animaux immunisés, il est très important de mélanger le sérum fourni par un certain nombre de chevaux ; on obtient ainsi un produit total, d'activité uniforme; de plus, le sérum normal de certains chevaux a la propriété de provoquer des éruptions érythémateuses, de gravité minime, mais gênantes; le mélange des sérums obvie à cet inconvénient.

Pour la conservation, le sérum est réparti purement dans de petits flacons stérilisés, fermés avec un bouchon de caoutchouc stérile et gardés à l'abri de la lumière.

Quand on n'est pas absolument sûr de l'asepsie on peut, avant le bouchage, projeter dans le flacon rempli de sérum un petit fragment de camphre saisi avec une pince flambée et passé dans la flamme du gaz. Behring pré-

pare son sérum sans s'attacher à obtenir une asepsie complète et assure sa conservation en lui ajoutant un peu d'acide phénique (0,5 p. 100).

Le sérum préparé purement peut être conservé, dans nos climats, plusieurs mois et même plusieurs années à l'état stérile, sans perdre de ses propriétés antitoxiques; il se produit quelquefois dans les flacons un trouble manifeste, mais ce trouble n'a aucune signification relativement à la pureté et à l'efficacité du sérum.

Sérum sec. — On peut obtenir un sérum sec en desséchant le sérum dans le vide; au moment des besoins, on redissout la substance sèche obtenue dans huit ou dix fois son poids d'eau stérile: cette solution donne fréquemment une petite tuméfaction locale passagère que ne produit pas le sérum naturel. Dans nos pays, le sérum liquide doit toujours être employé à l'exclusion du sérum sec; celui-ci pourra présenter des avantages dans les régions tropicales où le sérum liquide perd assez vite ses propriétés.

Lait antitoxique. — Le lait des femelles immunisées possède des propriétés antitoxiques (Ehrlich). Ce fait n'a guère qu'un intérêt théorique, la dilution extrême de l'antitoxine dans le lait rendant celui-ci incapable d'être utilisé dans la pratique médicale.

On peut néanmoins condenser sous un petit volume l'antitoxine que contient le lait et obtenir un produit utilisable pour les recherches de laboratoire. On s'adressera au lait de la vache ou de la chèvre; on ne peut guère obtenir qu'un lait actif au cinquantième (Voy. plus loin).

Wassermann traite ainsi le lait pour y condenser l'antitoxine : à un litre de lait recueilli aseptiquement (Voy. p. 34) on ajoute 20 centimètres cubes de solution normale de chlorure de sodium et de la présure en quantité suffisante pour obtenir une coagulation complète et rapide: le liquide clair est décanté, puis agité avec du chloroforme pour le débarrasser des corps gras; le mélange est abandonné à lui-même, puis on décante le liquide aqueux. Ce liquide est précipité par le sulfate d'ammoniaque; le précipité recueilli sur un filtre est desséché dans le vide et redissous dans une quantité d'eau dix fois moindre que la quantité du liquide où a eu lieu le précipité.

Propriétés du sérum. — Le sérum des animaux immunisés est *antitoxique* : son mélange, en quantité convenable, à la toxine rend celle-ci inoffensive.

Le sérum doit cette propriété à une substance spéciale, l'*antitoxine*, dont la nature n'est pas mieux connue que celle de la toxine; comme cette dernière, elle est altérée par la chaleur, précipitée par l'alcool et entraînée par les précipités formés au sein des liquides qui la renferment en dissolution. Elle est sécrétée dans l'organisme sous l'influence de la toxine : « sous l'influence de la toxine certaines cellules de l'organisme ont acquis une propriété sécrétoire nouvelle et persistante » (Salomonsen et Madsen).

L'antitoxine sature la toxine, *in vitro* et dans l'organisme; elle jouit de *propriétés préventives* et *thérapeutiques* : un cobaye auquel on donne une dose suffisante de sérum supporte ensuite une quantité de toxine diphtérique sûrement mortelle pour des cobayes non préparés; de même, on peut injecter d'abord la toxine, et plusieurs

heures après, le sérum, l'animal ne périra pas. L'immunité se produit rapidement, mais ne dure pas; elle a complètement disparu au bout de quelques jours ou de quelques semaines.

La quantité de sérum nécessaire pour guérir un animal qui a reçu de la toxine varie avec divers facteurs qui sont : le poids de l'animal, la quantité et l'activité de la toxine employée, et enfin l'activité du sérum. Il est très important de connaître l'activité du sérum que l'on emploie et l'on a établi des règles pour juger de cette activité (Voy. plus loin).

Le sérum antitoxique n'est pas *bactéricide*; il possède, assez irrégulièrement, la *propriété agglutinante*. L'agglutination se produit dans les dilutions à 1 p. 10 et 1 p. 20, elle peut être visible à l'œil nu, des grumeaux se précipitant au fond du tube (Nicolas). Elle manque souvent. Le sérum des individus atteints de diphtérie a parfois aussi des propriétés agglutinantes (Bruno).

Le sérum se montre *préventif* et *thérapeutique* chez les animaux inoculés avec une *culture vivante*; la propriété thérapeutique se manifeste encore quand le sérum est injecté douze et dix-huit heures après le virus.

Chez le cobaye, l'injection de sérum pratiquée avant l'inoculation vulvaire ou trachéale n'empêche pas le développement de la fausse membrane, mais préserve l'animal de toute intoxication, de toute maladie générale; dès le second jour, les fausses membranes se détachent et la réparation de la muqueuse commence. Pratiquée après production expérimentale des fausses membranes sur les muqueuses du cobaye, l'injection de sérum amène au bout de quelques heures la disparition de l'œdème et de la tuméfaction et, dès le deuxième jour, la chute de la fausse membrane.

Les fausses membranes produites dans la trachée du lapin par l'association du Streptocoque et du Bacille de Klebs-Löffler résistent beaucoup plus à l'action du sérum ; une injection de 5 et même de 10 centimètres cubes de sérum ne suffit pas à sauver l'animal; cependant Roux et Martin sont arrivés plusieurs fois à guérir des lapins ainsi infectés en répétant à plusieurs reprises les injections de sérum.

Roux et Martin ont essayé dans ces cas le mélange des deux sérums antistreptococcique et antidiphtérique, mais les résultats sont médiocrement satisfaisants (Voy. *Streptocoque*).

Essai du sérum. — 1° Behring estime l'activité d'un sérum d'après la quantité nécessaire pour immuniser un gramme d'animal contre un volume de toxine sûrement mortel injecté douze heures après le sérum ; il dit, par exemple, qu'un sérum est *actif au millième* quand un centimètre cube de ce sérum immunise un kilogramme de cobaye contre une dose de toxine capable de tuer dans un délai connu.

Ce mode d'appréciation n'est pas très rigoureux, mais il a l'avantage d'être commode.

2° Behring employa ensuite une autre unité de mesure : l'unité est constituée par la quantité de sérum nécessaire pour immuniser

5 000 grammes de cobaye (soit dix cobayes de 500 grammes) contre une dose dix fois mortelle d'une culture diphtérique âgée de deux jours, le sérum étant injecté vingt-quatre heures avant la culture; on apprécie ainsi la propriété thérapeutique du sérum contre l'infection et non contre l'intoxication.

3° Behring et Ehrlich ont adopté une nouvelle unité de mesure : l'*unité immunisante* ou *unité antitoxique* est représentée par $0^{cc},1$ d'un sérum qui, mélangé à $0^{cc},9$ de toxine normale (tuant sûrement le cobaye à la dose de $0^{cc},1$), la neutralise au point que le mélange introduit sous la peau ne produise aucun œdème. Un centimètre cube d'un tel sérum contient donc 10 unités antitoxiques; un sérum dont $0^{cc},01$ neutralise 1 centimètre cube de toxine contient 100 unités antitoxiques au centimètre cube, etc.

4° Roux adopte comme notation le *pouvoir préventif*, rapport entre la quantité de sérum nécessaire pour préserver de la mort un cobaye qui reçoit douze heures après l'injection de sérum une injection de un demi-centimètre cube d'une culture fraîche et bien virulente, et le poids du cobaye. Un sérum qui à la dose de 0,1 préserve un cobaye de 500 grammes, est dit actif au 1/5 000e, etc.

Dans la pratique il est utile de contrôler l'une par l'autre les deux méthodes de Behring-Ehrlich et de Roux : on dit, par exemple, qu'un sérum possède 100 unités antitoxiques au centimètre cube, et qu'il est préventif au 1/50 000e.

Un sérum actif à 1/50 000e suffit pour le traitement de la diphtérie humaine, mais on obtient aisément du sérum actif au 1/70 000e et au 1/100 000e. Le sérum préparé à l'Institut Pasteur avec les anciennes toxines possédait 100 unités antitoxiques par centimètre cube et était préventif au 1/50 000e; aujourd'hui le sérum préparé avec les toxines en bouillon de Martin, dix fois plus actives, possède 200 unités antitoxiques et est préventif au 1/100 000e.

Applications thérapeutiques. — L'application de la sérothérapie au traitement de la diphtérie humaine a donné les résultats que permettait de prévoir l'expérimentation sur les animaux; la sérothérapie de la diphtérie constitue aujourd'hui un des plus beaux chapitres de la thérapeutique.

Le sérum est injecté à des doses de 10 à 20 centimètres cubes données une fois ou répétées suivant la gravité des cas; ce n'est pas ici le lieu d'insister sur la pratique du traitement.

L'action préventive du sérum a été utilisée pendant des épidémies de diphtérie; l'immunité ainsi conférée est peu durable (trois semaines à deux mois). La dose préventive est de 5 centimètres cubes de sérum (Roux).

CHAPITRE XVIII

LE BACILLE DU TÉTANOS

Le Bacille du tétanos a été découvert par Nicolaïer. On rencontre le tétanos chez l'homme et toutes les espèces animales domestiques.

C'est principalement à la suite des plaies du pied qu'apparaît le tétanos chez le cheval, l'âne, la vache, etc. ; on a vu souvent le tétanos sévir en quelque sorte d'une manière épidémique sur des séries de chevaux soumis à la castration ; les germes étaient, dans ce cas, transportés par les casseaux. — On sait que le tétanos de l'homme peut succéder à une blessure accidentelle ou à une opération chirurgicale qui ont introduit le germe spécifique dans l'organisme ; on a beaucoup parlé aussi d'un tétanos dit spontané, se développant en l'absence de toute solution de continuité des téguments : ces faits de tétanos spontané relèvent, soit d'une infection par l'intestin, soit plutôt de l'introduction ancienne de germes dans l'organisme à la faveur d'une plaie depuis longtemps cicatrisée et oubliée : Vaillard et Rouget ont montré que les spores introduites dans l'organisme peuvent y sommeiller pendant un temps très long, germer ensuite sous l'influence de causes diverses et provoquer un tétanos qui semble spontané.

Le germe du tétanos est très répandu dans les milieux extérieurs ; quand on inocule à un cobaye de la terre de jardin, de la boue de rue, de la vase, il succombe à peu près fatalement au tétanos ou à la septicémie de Pasteur (Nicolaïer) ; de même, le bacille de Nicolaïer se rencontre dans le contenu intestinal et les fèces d'un grand nombre d'animaux ; dans les milieux extérieurs, le Bacille du tétanos se rencontre à l'état de *spores*.

Article I. — TÉTANOS EXPÉRIMENTAL.

La *souris*, le *rat*, le *cobaye* sont très sensibles au tétanos ; le *lapin* l'est moins ; le *chien* est très résistant, le *pigeon* et la *poule* sont réfractaires.

Il existe plusieurs procédés pour conférer le tétanos aux animaux réceptifs :

1° Inoculation de pus prélevé au niveau d'une plaie tétanique de l'homme ou d'un animal ;

2° Inoculation de terre ;

3° Inoculation d'une culture pure du Bacille de Nicolaïer ;

4° Inoculation de spores tétaniques isolées des cultures ;

5° Inoculation de toxine (Voy. plus loin).

Quel que soit le mode d'inoculation employé, on observe un fait constant, c'est que le Bacille du tétanos n'envahit jamais l'organisme : on ne le retrouve absolument qu'au lieu de l'inoculation.

Quelques heures après celle-ci, le nombre des bacilles est en voie de diminution et bientôt on ne peut plus constater la présence du germe que par les cultures. Quand on a inoculé une culture à dose strictement suffisante, les produits recueillis après la mort dans la région infectée ne sont pas réinoculables ; au contraire, le pus recueilli dans la plaie d'un tétanique est inoculable aux animaux réceptifs, mais il est impossible d'effectuer plus de quatre passages, au maximum ; dès le second passage, l'animal inoculé meurt moins rapidement.

Inoculation de terre ou de pus tétanique. — L'inoculation se fera de préférence sous la peau ou dans les muscles de la cuisse chez le cobaye ou la souris.

Symptômes et lésions. — Au lieu d'inoculation il se produit de la tuméfaction ; la région est empâtée et douloureuse ; puis, au bout de trois ou quatre jours apparaissent les symptômes du tétanos. Ceux-ci débutent toujours par les régions les plus voisines du lieu inoculé ; dans le cas actuel, la rigidité du membre postérieur inoculé sera le premier symptôme, puis les contractures se généralisent : il se produit des attaques convulsives sous l'influence des plus légères excitations (attouchement, courant d'air, bruit, etc.) ; le tableau symptomatique reproduit exactement celui que l'on observe chez l'homme, et la mort survient vingt-quatre à quarante-huit heures après le début des accidents tétaniques.

A l'autopsie, on trouve au point d'inoculation, soit un foyer purulent, soit une sorte d'escarre jaune et sèche ou un exsudat membraneux, épais et cohérent ; les tissus voisins sont le siège d'une infiltration œdémateuse. A l'examen microscopique, on trouve constamment à côté du Bacille de Nicolaïer de nombreux microbes associés parmi lesquels une ou deux espèces dominent ; les lésions purulentes, membraneuses, nécrotiques sont dues à ces microbes associés. Les viscères sont sains et présentent seulement une légère congestion liée à la gêne respiratoire qui précède la mort.

Inoculation de cultures pures. — Les inoculations de cultures pures peuvent être pratiquées sous la peau, dans les muscles, le péritoine, les veines, sous la dure-mère, sur la conjonctive oculaire ; seule, l'inoculation par les voies digestives échoue ; la voie sous-cutanée ou intramusculaire constitue le mode d'infection le plus rapide et le plus sûr.

Des doses très faibles de cultures en bouillon suffisent pour con-

férer le tétanos aux animaux réceptifs : un cinquantième de centimètre cube donne à la souris et au cobaye un tétanos typique débutant douze à vingt heures après l'inoculation et entraînant la mort en trente-six ou quarante heures. Le lapin exige des doses de $0^{cc},5$ à $1^{cc},5$, encore les premiers symptômes ne surviennent-ils que du deuxième au huitième jour et la mort seulement trois à dix jours après le début du tétanos.

Symptômes et lésions. — Quelle que soit la dose de culture inoculée, il se produit avant l'apparition des premiers symptômes une période d'incubation dont la durée varie avec l'activité de la culture, la dose injectée et la résistance de l'animal ; en règle générale, le tétanos est d'autant plus intense et plus rapidement mortel que la période d'incubation a été plus courte. Quand cette période dépasse quatre à cinq jours chez le cobaye et huit jours chez le lapin, le tétanos prend la forme chronique, dure dix à trente jours et peut aboutir à la guérison.

En tous cas, le tétanos commence par la région inoculée, puis se généralise si la dose de culture injectée est suffisante ; si cette dose est extrêmement faible, les symptômes tétaniques peuvent rester limités au membre ou au groupe de muscles intéressés par l'inoculation.

A l'autopsie, on ne trouve aucune lésion au point d'inoculation ; quelquefois cependant, il existe un peu d'hyperémie ou un œdème léger, très circonscrit. Il n'existe aucune lésion des viscères.

Le Bacille du tétanos injecté en culture ne pullule pas dans l'organisme des animaux et, au contraire, y disparaît rapidement : déjà, au bout de huit à dix heures, le nombre des bacilles est très minime; après vingt-quatre heures, il est souvent impossible de constater la présence des bacilles par l'examen microscopique ; mais en ensemençant un petit lambeau du tissu conjonctif prélevé au point d'inoculation, on obtient une culture, même quand la mort n'est survenue que plusieurs jours après l'inoculation. Les produits recueillis dans la région infectée ne sont jamais inoculables.

Les cultures filtrées sur la bougie Chamberland provoquent absolument les mêmes symptômes que les cultures entières ; nous reviendrons plus tard sur ce fait, mais, dès à présent, il suffit à établir que la culture inoculée provoque le tétanos grâce à la toxine qu'elle contient.

Inoculation des spores pures (Vaillard, Vincent et Rouget). — Quand on chauffe pendant trois heures à + 80° une culture tétanique sporulée en bouillon, la toxine est détruite et le liquide ne contient plus que des spores qui n'ont pas été altérées par le chauffage.

On peut inoculer au cobaye des doses de 0,5 et 0,6 centimètre cube de ces cultures chauffées sans que l'animal présente aucun symptôme tétanique : les spores pures ne germent pas dans les tissus

vivants et sains et ne peuvent par conséquent y fabriquer la toxine qui produit le tétanos. Les spores ainsi inoculées à l'état pur sont rapidement englobées et détruites par les phagocytes.

Si l'on ajoute aux spores, avant de les injecter, une substance chimiotaxique négative, telle qu'une gouttelette d'acide lactique, par exemple, les leucocytes ne peuvent aborder les spores, celles-ci, abandonnées à elles-mêmes, ne tardent pas à germer et le tétanos éclate.

On arrive au même résultat en protégeant mécaniquement les spores contre les phagocytes, par exemple en mélangeant les germes avec un peu de sable stérile et enfermant le tout dans un petit étui de papier filtre préalablement stérilisé ; le sac de papier constitue une barrière que ne peuvent franchir les leucocytes, les spores germent à son intérieur, fabriquent la toxine, et l'animal succombe au tétanos.

Quand on produit au point d'inoculation un traumatisme tel qu'une brûlure, une attrition violente des tissus, etc., la phagocytose se trouve entravée, les leucocytes ne peuvent plus aborder les spores, celles-ci se développent et le tétanos se manifeste.

Aussi curieux et important dans l'étiologie du tétanos est le rôle des *microbes favorisants* : quand un animal succombe à l'inoculation d'une terre tétanigène, on trouve dans le pus, à côté du bacille de Nicolaïer, des microbes étrangers; Vaillard et Rouget ont isolé plusieurs de ces microbes et ont obtenu des cultures qui, mélangées à des spores pures, favorisent le développement du tétanos de la même façon que l'adjonction d'une substance chimiotaxique négative ; la terre qui contient des spores tétaniques ne donne le tétanos que si elle renferme en même temps de ces microbes favorisants.

Expérience. — On prend une petite quantité de terre tétanigène et on la divise en deux lots : un lot est gardé comme témoin, l'autre est délayé avec soin dans de l'eau stérile, aspiré dans une pipette à étranglement, scellé dans cette pipette et chauffé pendant une heure à 85°. Les spores tétaniques résistent à ce chauffage ; au contraire, les microbes non sporulés sont tués. Si on inocule à des cobayes de la terre non chauffée, ces cobayes succombent au tétanos ; au contraire, les cobayes ayant reçu la même quantité de terre chauffée restent indemnes.

D'autre part, on a fait des cultures aérobies avec la même terre ; ces cultures injectées à des cobayes provoquent des lésions purulentes, mais jamais le tétanos. Inocule-t-on à un troisième lot de cobayes un peu de terre chauffée additionnée d'une petite quantité de la culture aérobie, les animaux succombent tous au tétanos.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Bacille du tétanos se rencontre tantôt sous la forme non sporulée, tantôt sous la forme sporulée.

Dans les cultures jeunes, dans certains pus, on voit des bâtonnets très fins, allongés, à bouts non arrondis, mesurant 3 à 4 μ de long sur 0,3 à 0,4 μ de large, et qui présentent, à l'abri de l'oxygène, des mouvements lents et flexueux ; ces mouvements cessent dès que se forme la spore.

Dans les cultures à 37° âgées de trente-six à quarante-huit heures, et quelquefois dans le pus, on rencontre des formes sporulées ; vers le dixième jour on ne trouve guère dans ces cultures que des bacilles avec spores ; dans les cultures à 20 ou 25°, la formation des spores est tardive et ne commence guère qu'au dixième jour.

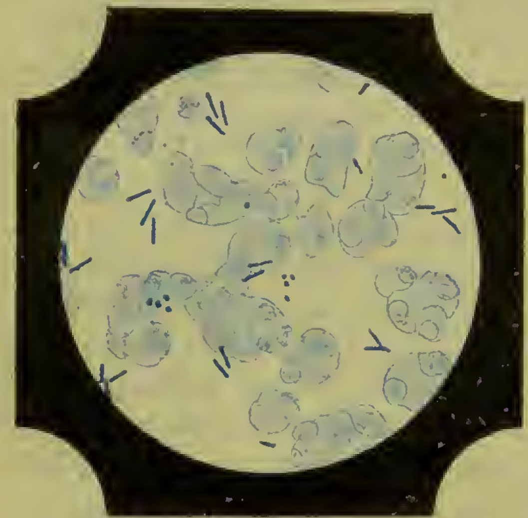


Fig. 198. — Bacille du tétanos. — Pus de cobaye (association avec un coccus). — Thionine phéniquée (Reich. ; Obj. 1/12 imm. ; Oc. II).



Fig. 199. — Bacille du tétanos. — Culture en bouillon. — Formes sporulées. — Thionine phéniquée (Reich. ; Obj. 1/12 imm. ; Oc. II).

Les bacilles sporulés se présentent sous la forme de bâtonnets grêles, assez courts, portant à une de leurs extrémités une petite sphère exactement terminale, réfringente et dont le diamètre mesure deux à quatre fois la largeur du bacille : c'est la forme dite en *épingle*.

Dans les vieilles cultures, le corps du bâtonnet se désagrège et l'on ne voit plus que les spores ; à côté de celles-ci, on peut rencontrer des formes d'involution renflées, irrégulières, en haltères, etc.

Coloration. — Le Bacille du tétanos se colore aisément par les couleurs basiques d'aniline ; il prend le Gram. Quand on colore des bacilles sporulés par les méthodes ordinaires, les bâtonnets seuls et les contours des spores fixent la matière colorante, le centre de celles-ci reste incolore, on a une figure très caractéristique rappelant l'aspect d'une raquette.

On colore aisément les spores par un des procédés exposés page 148.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Bacille du tétanos est anaérobie ; il est cependant moins exigeant sous ce rapport que le Vibrion septique : il peut se développer dans des milieux contenant de petites quantités d'oxygène et s'accoutumer à vivre dans un air faiblement raréfié. Dans la pratique des cultures il faut néanmoins le traiter comme un anaérobie strict.

Il se développe entre + 14° et 43° ; au-dessous de 20° la culture est minime ; les spores se forment très lentement au-dessous de 25° ; la température optima est de 38°. A 42° et 43° les bacilles se développent rapidement, mais peu d'entre eux forment des spores.



Fig. 200. — Bacille du tétanos. — Culture en gélatine (piqûre). D'après Kitasato.

Le Bacille de Nicolaïer se développe sur les milieux usuels à base de bouillon, neutres, légèrement alcalins ou légèrement acides, mais il est indispensable que ces milieux soient préparés avec du *bouillon frais* (Kitasato). Le bouillon de bœuf ordinaire lui est très favorable ; au contraire, les liquides organiques comme l'albumine de l'œuf, le sérum frais, etc., donnent des cultures peu abondantes.

Bouillon. — A l'abri de l'air, entre + 37° et 39°, le développement est rapide ; vers la vingt-quatrième heure apparaît un trouble général, en même temps que de fines bulles de gaz gagnent la surface du liquide ; le trouble s'accentue les jours suivants, puis, vers le quinzième jour, la culture se ralentit et il se forme un précipité au fond du vase ; le bouillon s'éclaircit.

Pendant la culture, il se dégage en quantité modérée de l'hydrogène, de l'azote et des carbures d'hydrogène ; la culture dégage une odeur puante caractéristique que l'on a comparée à celle de la corne brûlée.

Gélatine. — *Culture en profondeur.* — La piqûre profonde dans un tube de gélatine privé d'air (p. 105), donne au bout de quatre à six jours, aux environs de + 20°, un développement de petits points nuageux, d'où partent, à angle droit, de très fines et nombreuses aiguilles ; le nuage s'étend, envahit progressivement la gélatine et

commence à la liquéfier vers le dixième jour; il se forme alors au fond du tube un dépôt floconneux au-dessus duquel la gélatine est claire et fluide. Les spores ne se forment que lorsque la liquéfaction a commencé. Il se dégage quelques bulles de gaz.



Fig. 201. — Bacille du tétanos. — Culture en gélatine (colonies isolées). D'après Fraenkel et Pfeiffer.

Colonies isolées (tube de Vignal). — Vers le quatrième ou sixième jour, apparition de petits points blanchâtres, formant bientôt des sphères nuageuses d'où partent de fins rayons disposés en houppe; des bulles de gaz se produisent au voisinage des colonies; vers le dixième ou quinzième jour, la liquéfaction commence et se poursuit lentement; les colonies forment des flocons blanchâtres nageant dans la gélatine liquéfiée.

Gélose. — A 37° l'ensemencement en piqûre profonde produit rapidement une culture nuageuse peu caractéristique ; de nombreuses bulles de gaz fragmentent la gélose.

Sérum. — En sérum coagulé, inoculé par piqûre et recouvert ensuite d'une couche de gélose, on obtient une culture nuageuse, le sérum n'est pas liquéfié (Sanchez Toledo et Veillon).

Pomme de terre. — Sur la pomme de terre, à l'abri de l'air, le Bacille de Nicolaïer pousse difficilement; il forme « une couche mince, humide, luisante, assez semblable à celle que donne le Bacille typhique, composée de très longs bâtonnets, sans renflement ni spore ». (Vaillard et Vincent).

Lait. — Le Bacille du tétanos se développe dans le lait sans le coaguler.

Article III. — RECHERCHE ET ISOLEMENT.

Quand on veut rechercher et isoler le Bacille de Nicolaïer dans une terre, on inocule à un cobaye un fragment de cette terre, puis on isole le bacille du cadavre de l'animal.

La recherche du bacille dans le cadavre d'un homme ou d'un animal doit être effectuée exclusivement au niveau de la plaie tétanique. Elle sera conduite de la façon suivante :

a. **Examen microscopique.** — Des lamelles préparées avec le pus ou les produits membraneux recueillis dans la plaie sont colorées

par le krystall-violet phéniqué ou la fuchsine de Ziehl diluée; quelques préparations seront soumises à la réaction de Gram qui colore le Bacille de Nicolaïer.

Il est souvent nécessaire de préparer plusieurs lamelles pour rencontrer le bacille qui existe en quantité minime et dont la présence peut être masquée par le grand nombre des microbes associés. Rarement le bacille est en quantité notable et les microbes associés sont peu nombreux; la figure 198 reproduit une lamelle de pus obtenue dans un cas de ce genre: ici, la recherche est facile et rapide.

De ce que l'on n'a pas rencontré le bacille à l'examen microscopique, il ne faut pas rejeter l'hypothèse de son existence, mais soumettre le pus à l'épreuve des cultures.

b. **Cultures, isolement.** — Kitasato a le premier indiqué une méthode permettant d'extraire le Bacille du tétanos, à l'état de pureté, d'un pus tétanique. Son procédé, modifié depuis par Vaillard et Vincent, est basé sur la résistance de la spore à la chaleur et les propriétés anaérobies du bacille. On opérera ainsi qu'il suit:

1° Ensemencer le pus ou le produit tétaniques dans du bouillon de bœuf et cultiver dans le vide à 38°.

2° Dès le cinquième ou sixième jour, le bouillon troublé contien de nombreux bacilles en épingle mêlés à d'autres microbes anaérobies; on aspire un peu de la culture dans un tube mince (l'effilure d'une pipette Pasteur) dont, après remplissage, on scelle les deux extrémités par un trait de chalumeau. Le tube ainsi préparé est soumis pendant une ou deux minutes à la température de 100°. Ce chauffage respecte les spores du tétanos, mais tue la plupart des germes étrangers.

3° Le contenu du tube chauffé est ensemencé en bouillon dans le vide; dans la culture obtenue, le Bacille du tétanos domine et peut même se trouver à l'état pur. En répétant deux ou trois fois le chauffage et la culture dans les mêmes conditions, il est possible d'obtenir le Bacille du tétanos à l'état pur.

4° Souvent, cependant, le Bacille de Nicolaïer reste mélangé au Vibrion septique et à un autre bacille anaérobie, non pathogène et à spore non exactement terminale. Dans ce cas, l'opération devra être terminée par un isolement en tube de Vignal. On ensemence un tube de gélatine avec une trace de culture et on en aspire le contenu dans des tubes de Vignal (Voy. p. 112). On reconnaît aisément les colonies isolées du Bacille de Nicolaïer aux caractères que nous avons exposés plus haut; on prélève purement une trace d'une colonie et on la reporte en bouillon.

c. **Inoculations.** — On inocule directement au cobaye ou à la sou-

ris un peu de pus ou un petit fragment isolé dans la plaie télanigène; les symptômes du tétanos apparaissent rapidement chez l'animal inoculé. On soumettra également les cultures à l'épreuve de l'inoculation.

Article IV. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Les spores du Bacille du tétanos sont douées d'une très grande résistance aux agents de destruction. En vase clos, en milieu humide, elles supportent pendant six heures une température de +80° et pendant plus de deux heures une température de 90°. Elles résistent trois à quatre minutes à la température de l'ébullition, mais sont sûrement détruites à cette température au bout de huit minutes.

Desséchées, les spores mêlées à de la terre et conservées à l'air libre, à l'abri de la lumière, conservent pendant plusieurs mois leur vitalité et leur virulence (Kitasato), mais l'exposition de spores desséchées sur un papier ou un fil de soie à l'air et à la lumière diffuse, ou à la radiation solaire, leur fait subir rapidement des modifications profondes.

Ces modifications varient avec la durée d'exposition des spores. Leur germination devient d'abord moins rapide et leur culture moins active : puis elles ne donnent plus naissance qu'à des bacilles asporogènes et non pathogènes; enfin elles périssent. Tous les termes de cette série se trouvent réalisés en moins d'un mois. Mais, quand la lumière agit à l'abri de l'air, les spores desséchées résistent mieux et peuvent encore germer et donner des bacilles sporulés et actifs après plus de deux mois dont cinquante-neuf heures d'insolation (Vaillard et Vincent).

Le Bacille du tétanos dans les couches superficielles du sol est donc exposé à des causes incessantes de destruction et d'atténuation; il disparaîtrait rapidement s'il ne trouvait dans son passage à travers le tube digestif des herbivores des conditions favorables à son entretion et à sa multiplication (Sanchez Toledo et Veillon).

Desséché dans le pus, les liquides albumineux, dans les corps poreux, tels qu'échardes de bois provenant de plaies tétaniques, le Bacille tétanique garde longtemps sa vitalité et sa virulence.

§ 2. — TOXINE.

Knud Faber, puis Vaillard et Vincent, en filtrant des cultures de tétanos en bouillon ont obtenu un liquide très toxique dont l'inoculation produit chez les animaux un tétanos typique (1).

(1) Brieger, Verhoogen et Boer, Kitasato avaient isolé des cultures tétaniques des subs-

Préparation de la toxine. — On ensemence le bacille dans du bouillon de bœuf peptonisé frais et disposé dans un flacon selon le procédé indiqué page 104. Après quatre à cinq semaines de culture à l'étuve à 38°, à l'abri de l'air, la culture est filtrée sur la bougie Chamberland. On obtient ainsi un liquide très toxique, tuant la souris à la dose de 1/4000e de centimètre cube injecté sous la peau.

On peut encore augmenter d'une manière remarquable la toxicité des cultures en bouillon en utilisant la propriété du microbe de se développer dans un milieu où une première génération a déjà vécu et élaboré son poison. Une culture en bouillon âgée de vingt jours est filtrée sur la bougie; dans le filtrat, on ensemence de nouveau du Bacille tétanique. Au bout de vingt jours, on filtre une seconde fois ; au filtrat on ajoute environ 1/15 de bouillon neuf stérile, puis on ensemence une troisième fois avec le bacille. Cette troisième culture filtrée donne une toxine capable de tuer les souris au 1/100000e de centimètre cube.

L'expérience a montré que la composition du milieu de culture influe beaucoup sur l'activité du poison ; le bouillon de bœuf peptonisé est l'un des milieux les plus favorables.

Action de la toxine sur les animaux. — L'inoculation de doses minimes de toxine produit un tétanos mortel.

Les toxines les plus actives obtenues par Vaillard et Vincent tuent le cobaye au millième de centimètre cube, la souris au 1/100 000e.

Quand on injecte une quantité moindre de toxine, on détermine un tétanos local intéressant uniquement les muscles voisins du point d'inoculation; la toxine se comporte alors comme un poison neuromusculaire.

La toxine tétanique se diffuse très rapidement dans l'organisme; si on en injecte une fraction de goutte vers l'extrémité terminale de la queue d'un rat, région où l'absorption est très lente, on peut, trois quarts d'heure après l'injection, sectionner la queue à 2 ou 3 centimètres au-dessus du point inoculé sans que l'évolution de la maladie soit modifiée ; l'animal meurt presque aussi rapidement que le témoin.

Le poison tétanique injecté sous la peau ou dans le sang va atteindre de préférence les cellules de la moelle épinière dont les lésions produisent les contractures caractéristiques : il existe une affinité spéciale entre la toxine tétanique et la cellule nerveuse ; cette affinité se manifeste *in vitro*.

tances possédant les caractères des ptomaïnes et auxquelles ils attribuaient les symptômes du tétanos; on sait aujourd'hui que les ptomaïnes ne sont pour rien dans la toxicité des cultures du Bacille de Nicolaïer.

Wassermann et Takaki, mélangeant avec de la toxine tétanique une émulsion de substance cérébrale puis centrifugeant le mélange, obtiennent un liquide opalin ne contenant presque plus de toxine. La toxine n'a pas été détruite par cette opération, mais simplement fixée comme une matière colorante par la substance nerveuse ; elle adhère à cette substance et peut être mise de nouveau en évidence, sa nature ne s'est pas modifiée (Metchnikoff et Marie, Danysz) : les mélanges neutres de cerveau et de toxine redeviennent toxiques en vieillissant, la toxine diffusant de nouveau dans le liquide ambiant, redevenant libre; au contraire, les mélanges actifs de toxine et d'antitoxine deviennent, avec le temps, moins toxiques (Knorr). Le carmin émulsionné dans la solution physiologique de NaCl agit de la même façon, à la condition de n'avoir été ni stérilisé à la vapeur ni macéré; il fixe la toxine, le filtrat est inactif (Stoudensky). Dans ces mélanges, la toxine est fixée par les grains de substance cérébrale ou de carmin ; injectée dans l'organisme, elle n'a pas le temps de diffuser, les leucocytes l'absorbent et la détruisent.

Dans l'organisme il se produit un phénomène analogue à celui que nous venons d'étudier *in vitro*. La toxine injectée sous la peau du cobaye est fixée après un certain nombre d'heures par les cellules nerveuses de la moelle, et c'est alors qu'éclatent les symptômes tétaniques. La démonstration directe de ce fait est fournie par la gravité de l'inoculation en plein tissu nerveux.

Le lapin est très résistant à l'inoculation du poison tétanique sous la peau ou dans le sang : il faut une dose de 2,5 centimètres cubes de toxine pour le tuer en quatre jours; or, il succombe en moins de vingt heures à l'injection intracérébrale de 10 centimètres cubes de la même toxine. Dans ce cas la maladie évolue suivant un type spécial, c'est le *tétanos cérébral* de Roux et Borrel ; l'animal présente une excitation extraordinaire, est en proie à des hallucinations, à des terreurs soudaines, à la folie en un mot, puis apparaissent des crises convulsives intermittentes, des troubles moteurs, de la polyurie, la mort arrive enfin. Le cobaye, le rat, prennent de même le tétanos cérébral avec des doses minimes de toxine injectées dans la substance des hémisphères.

La résistance du lapin à la toxine inoculée sous la peau ou dans le sang ne tient donc pas à une insensibilité relative des cellules nerveuses, mais à ce que beaucoup du poison injecté n'arrive pas à ces cellules et est détruit dans un endroit indéterminé (probablement les phagocytes) de l'organisme (Roux et Borrel).

Technique. — Après incision des parties molles, faire avec un foret un trou dans le crâne en limitant la perforation au moyen d'un curseur de façon à ne pas blesser la dure-mère, puis enfoncer l'aiguille de la seringue à la profondeur voulue, déterminée d'avance par un curseur, et injecter la toxine. Les animaux tolèrent très bien ces inoculations intracérébrales, ou

peut sans accident injecter ainsi du bouillon stérile à la dose de 8 gouttes chez le cobaye en deux piqûres, et de 0,5 centimètre cube chez le lapin.

Nature du poison. — Le poison tétanique est extraordinairement actif.

Évaporé dans le vide, un centimètre cube d'une toxine tuant la souris à la dose de 1/100000e de centimètre cube donne un résidu fixe de 0gr,040 ; soumis à la calcination, ce résidu subit une perte de 0gr,025 représentant la matière organique; admettons, ce qui est évidemment inexact, que la totalité de la matière organique soit constituée par la toxine elle-même, il en résultera que ces 25 milligrammes de toxine peuvent tuer cent mille souris, ce qui porte la dose mortelle du principe actif à 0gr,00000025 pour une souris; or, sur cette quantité, une très large part appartient aux principes inactifs tels que peptones, etc. (Vaillard et Vincent).

Le poison tétanique présente tous les caractères des enzymes ou des diastases; chimiquement, il est très analogue à celui de la diphtérie. Il est profondément altéré par un chauffage de trente minutes à 65° ; il est détruit complètement en trois heures à 80°.

Conservé en vase clos, à l'abri de l'air et de la lumière, la toxine garde longtemps son activité ; mais elle s'affaiblit rapidement quand elle est exposée à la lumière diffuse et à l'action de l'air; sous l'influence des rayons solaires et de l'air, la toxicité disparaît en peu de jours.

Le poison tétanique a la propriété d'adhérer aux précipités amorphes que l'on produit au sein des liquides où il est en dissolution.

L'addition de chlorure de calcium à la toxine détermine un précipité de phosphate de chaux qui entraîne une partie de la substance active; après un lavage soigneux, un petit fragment de ce précipité gros comme la tête d'une épingle détermine, quand on l'insère sous la peau d'un cobaye, un tétanos mortel en une trentaine d'heures; après précipitation, il reste encore une grande quantité de toxine en dissolution dans le liquide.

Un peu de toxine tétanique obtenue par filtration, versée dans un tube de gélatine stérile, liquéfie en quelques jours cette gélatine : le phénomène est dû à l'existence dans la toxine d'un ferment diastasique liquéfiant, ferment qui semble être différent de la substance toxique.

Évaporée à + 25° dans le vide sur l'acide sulfurique, la toxine laisse un résidu brun, amorphe, extrêmement actif. L'alcool à 90° dissout une faible quantité de ce résidu et laisse, après évaporation, une substance blanchâtre, d'odeur vireuse et non toxique. La partie du résidu non dissoute par l'alcool est très soluble dans l'eau et donne un tétanos typique au cobaye ; l'alcool la précipite de sa solution aqueuse. La substance active contenue dans le résidu dialyse lentement.

§ 3. — VACCINATION.

I. — Behring et Kitasato échouent à conférer l'immunité aux animaux par l'injection de petites doses répétées de toxine tétanique : les animaux succombent au cours de l'immunisation ; ils emploient alors la méthode des inoculations combinées de toxine et de trichlorure d'iode (Voy. *Diphtérie*) et arrivent à vacciner les lapins.

II. — Brieger, Wassermann et Kitasato emploient pour la vaccination contre le tétanos la méthode de l'atténuation des cultures par le bouillon de thymus (Voy. *Dipthérie*). Une culture de tétanos en solution de peptone neutre, âgée de vingt-quatre heures et par conséquent asporulée, est mélangée à deux volumes de bouillon de thymus et injectée à doses progressives sous la peau des animaux ; cette méthode est compliquée et incertaine.

III. — Vaillard, avant le travail des auteurs précédents, était parvenu à vacciner les lapins et les cobayes en leur injectant des cultures partiellement dépourvues de leur toxicité par le chauffage ; nous lui empruntons la technique de l'immunisation d'un lapin :

A trois jours d'intervalle, on injecte dans une veine de l'oreille deux doses de 10 centimètres cubes d'une culture filtrée chauffée pendant une heure à 60°. Cinq jours après, on injecte 10 centimètres cubes du même filtrat chauffé une heure à 55° ; enfin, après un nouveau délai de cinq jours, on injecte 10 centimètres cubes de la culture chauffée à 50° pendant une heure. — Dès ce moment, l'animal est immunisé ; on renforce ensuite l'état réfractaire au moyen d'injections de cultures filtrées pratiquées tous les huit ou dix jours à des doses croissantes de 5, 10, 15, 30 centimètres cubes.

IV. — Roux et Vaillard emploient actuellement de préférence, pour pratiquer les inoculations vaccinales, la toxine additionnée de solution iodée (Voy. *Diphtérie*). Leur toxine est obtenue comme nous l'avons dit plus haut, elle doit tuer la souris à la dose de 1/4 000e de centimètre cube ; elle est mélangée à la solution de Gram au moment de l'utilisation. Nous décrirons, comme exemples, l'immunisation d'un lapin et d'un cheval :

Lapin. — Le premier jour l'animal reçoit sous la peau 3 centimètres cubes de toxine additionnés de 1 centimètre cube de solution de Gram.

Le cinquième jour on injecte de même 5 centimètres cubes de toxine + 2 centimètres cubes de solution de Gram.

Le neuvième jour on donne 12 centimètres cubes de toxine + 3 centimètres cubes de solution de Gram.

Le dix-septième jour l'immunisation de l'animal est obtenue ; son sérum présente la propriété antitoxique ; on peut dès lors lui donner de huit jours en huit jours, 5, 10, 15, 20, 30, 40 centimètres cubes de toxine pure ; plus tard, on rapprochera les injections et on les pratiquera dans le sang ou le

péritoine; on peut arriver à donner d'un seul coup jusqu'à 100 et 120 centimètres cubes de toxine.

Cheval. — On débute par une dose de 1 à 5 centimètres cubes d'un mélange à parties égales de toxine et de liqueur de Gram que l'on injecte sous la peau. Les injections sont répétées tous les trois ou quatre jours: dès le quinzième jour, on arrive à 10 centimètres cubes d'un mélange de deux parties de toxine pour une de liqueur iodée; on augmente progressivement la quantité injectée et la proportion de toxine dans le mélange. Du vingt-cinquième au trentième jour, on arrive à donner la toxine pure aux doses croissantes de 10, 15, 20 centimètres cubes, tous les deux ou trois jours; vers le quarantième jour, on injecte, soit sous la peau, soit dans la jugulaire, des doses croissantes de 50, 100, 150 centimètres cubes. Après les injections massives dans les veines, le cheval peut présenter des accidents passagers tels que sueurs, coliques, diarrhée, élévation de la température de 1° à 2°. L'immunisation est complète vers le troisième mois.

On peut recueillir du sang une dizaine de jours après la dernière inoculation; on maintient l'immunisation par des injections répétées tous les dix ou quinze jours de doses de 200 à 300 centimètres cubes de toxine.

V. — Vaillard a obtenu l'immunisation du lapin, en lui injectant à plusieurs reprises dans le tissu cellulaire sous-cutané de très petites doses de spores tétaniques privées de toxine et additionnées d'un peu d'acide lactique; l'animal ainsi vacciné résiste à l'inoculation de doses ordinairement mortelles de toxine tétanique, mais son sang n'a pas de pouvoir antitoxique appréciable.

§ 4. — SÉROTHÉRAPIE.

Les propriétés antitoxiques du sang des animaux immunisés contre le tétanos ont été mises en lumière par Behring et Kitasato. Le sang d'un lapin immunisé est capable de détruire les toxines sécrétées par le Bacille de Nicolaïer; cette propriété existe dans le sérum dépouillé de tout élément cellulaire et se manifeste *in vitro* et *in vivo*; elle manque dans le sang des animaux non réfractaires.

Le sang des animaux naturellement réfractaires, tels que la poule, ne possède pas la propriété antitoxique, mais il l'acquiert facilement quand on injecte à ces animaux de la toxine tétanique : l'injection de deux à trois doses de 20 centimètres cubes de toxine dans le péritoine d'une poule confère, au bout de douze à vingt jours, des propriétés antitoxiques énergiques au sang de l'animal. De même, le sang des lapins immunisés par injection de petites doses de spores ne possède pas de propriétés antitoxiques, mais on lui confère cette propriété en injectant aux animaux de la toxine tétanique.

Le lait des animaux immunisés possède également des propriétés antitoxiques actives; l'albumine de l'œuf des poules dont le sérum a été rendu antitoxique se montre inactive.

Roux et Vaillard ont fixé la technique et les indications de la sérothérapie du tétanos.

Préparation du sérum antitoxique. — On s'adresse de préférence au sérum du cheval pour les applications de la sérothérapie aux hommes et aux animaux ; pour les recherches de laboratoire, le lapin est une bonne source de sérum.

L'immunisation du cheval est pratiquée comme nous l'avons dit plus haut (1).

Dès le troisième mois, le cheval peut fournir du sérum ; on maintient et on exalte la puissance antitoxique de ce sérum en injectant à intervalles de quelques jours des fortes doses de toxine dans la jugulaire ou sous la peau ; après chacune de ces injections massives, la propriété antitoxique du sang diminue momentanément ; aussi faut-il attendre une dizaine de jours après l'injection pour prélever le sang.

Le sérum sera conservé avec les précautions ordinaires ; il garde toutes ses propriétés quand on le soumet à la dessiccation dans le vide ; on peut ainsi conserver indéfiniment et sous un petit volume du sérum très actif.

Essai du sérum. — Pour évaluer l'activité du sérum, on adopte la notation de Behring qui mesure cette activité d'après la quantité de sérum nécessaire pour immuniser un gramme de souris. Le sérum obtenu par Roux et Vaillard est actif au 1/10 000 000e, c'est-à-dire qu'un dixième de centimètre cube de ce sérum suffit pour immuniser 100 kilogrammes de souris, ou qu'une souris de 20 grammes est rendue réfractaire par l'injection de 2 millionièmes de centimètre cube de sérum.

In vitro, on mesure le pouvoir antitoxique d'après la quantité de sérum nécessaire pour rendre inoffensif un volume donné de toxine d'activité connue ; la propriété immunisante d'un sérum croît parallèlement à la propriété antitoxique.

Propriétés du sérum. — *In vitro*, le sérum des animaux immunisés mélangé à de la toxine tétanique, la rend instantanément inoffensive ; la dose de sérum à ajouter à un volume donné de toxine pour la neutraliser varie avec l'activité de ce sérum ; on peut obtenir un sérum neutralisant vingt fois son volume de toxine.

L'injection dans le péritoine d'un cobaye d'une dose de sérum représentant la trois cent quarante-cinquième partie du poids de l'animal confère rapidement au sang une propriété antitoxique mani-

(1) Pour tous les détails de technique, se reporter à ce que nous avons dit à propos du sérum antidiphtérique.

feste ; le sang d'un lapin qui a reçu la cent cinquantième partie de son poids de sérum possède la propriété antitoxique et un pouvoir immunisant notable.

L'injection sous-cutanée de un centimètre cube de sérum antitoxique pratiquée dix à quarante minutes avant l'inoculation de 1/150e de centimètre cube de toxine (dose mortelle en quarante-huit heures pour les témoins), préserve les cobayes du tétanos ; mais, chez les animaux qui reçoivent la toxine moins de quarante minutes après le sérum, la prévention n'est pas complète, il se produit des symptômes tétaniques d'autant moins marqués que les animaux ont reçu le sérum plus longtemps avant le poison, cependant la guérison survient toujours.

Il est beaucoup plus difficile de prévenir le tétanos si on intervient seulement après l'injection de la toxine, pendant la période d'incubation ; de même, il est moins aisé de prévenir l'affection produite par le bacille pullulant dans les tissus.

Roux et Vaillard résument ainsi leurs recherches sur la prévention du tétanos :

« 1° Le sérum antitoxique prévient sûrement le tétanos, même à doses extrêmement petites, lorsqu'il est injecté avant la toxine tétanique. *L'immunité conférée par le sérum est passagère* ; elle diminue vers le quinzième jour et disparaît du quarantième au cinquantième jour.

« 2° Lorsque le sérum est injecté en même temps que la toxine, on observe toujours un tétanos local, même quand la quantité de sérum injectée est très grande.

« 3° Lorsque le sérum est injecté après la toxine, mais avant l'apparition de tout symptôme tétanique, il y a toujours un tétanos local. La dose de sérum nécessaire pour empêcher la mort est d'autant plus forte que celui-ci est injecté plus tard après l'infection. Après un certain temps écoulé, variable avec les animaux, la prévention n'est plus possible, même avec de grandes quantités de sérum.

« 4° Le tétanos est plus ou moins rapide et par conséquent plus ou moins facile à prévenir, selon le lieu où l'injection de la toxine est pratiquée. (Les animaux inoculés à la patte résistent mieux que ceux qui ont reçu la toxine sous la peau du thorax ou de l'abdomen.)

« Ces conclusions s'appliquent à des doses moyennes de toxine.

« 5° Lorsque l'infection est produite par le bacille tétanique pullulant dans les tissus, la prévention dépend encore de la quantité de sérum injecté et du temps écoulé entre le moment de l'infection et celui de l'intervention. Elle échoue le plus souvent quand les animaux sont inoculés de façon qu'ils aient un tétanos à marche rapide. Elle peut réussir dans les infections lentes, et encore, dans ces cas, la prévention n'est pas toujours définitive si on n'enlève pas le foyer. La maladie qui paraissait enrayée peut reprendre son cours et la mort survenir après des temps très longs. »

La guérison du tétanos déclaré est donc difficile à obtenir ; quand les premiers symptômes ont éclaté, la toxine a déjà agi sur les

éléments nerveux, l'antitoxine détruit le poison circulant dans le corps, mais ne peut rien sur les lésions acquises. De très fortes doses du sérum le plus actif restent impuissantes contre un tétanos à marche rapide, elles rendent le sang antitoxique et immunisant, mais la maladie suit son cours. Dans les cas de tétanos moins sévères, le sérum prolonge la vie, mais si on n'enlève pas le foyer d'infection la maladie reprendra son évolution quand le pouvoir antitoxique du sang aura diminué. Aussi chez l'homme la sérothérapie du tétanos n'a-t-elle fourni que des résultats plus que médiocres ; le traitement échoue dans les formes graves, il ne semble donner quelques résultats que dans les cas subaigus et chroniques, et on sait que ces cas, traités par les méthodes ordinaires, se terminent souvent par la guérison. Quoi qu'il en soit, la sérothérapie est inoffensive et doit être tentée dans le tétanos humain.

Voici, d'après Roux et Vaillard, la conduite à tenir :

« Injecter aussitôt et d'emblée une centaine de centimètres cubes de sérum très actif, exciser le foyer d'infection. Administrer encore le lendemain et la surlendemain 100 centimètres cubes de sérum par jour. Si le tétanos est enrayé, après une dizaine de jours, surtout si on n'a pas pu enlever le foyer, donner encore du sérum pour prévenir ces retours de tétanos que nous avons signalés chez les animaux. »

Devant l'échec du traitement, on a cherché à prévenir le tétanos. Toutes les fois que l'on se trouve en présence d'une plaie contuse et souillée de terre, il est indiqué d'injecter préventivement 20 à 30 centimètres cubes de sérum antitétanique. Nocard, en médecine vétérinaire, a obtenu de très beaux résultats en faisant l'injection antitétanique préventive dans les cas de blessures du pied et après la castration.

Inoculations intracérébrales. — En s'en tenant à ce que nous venons de dire, il est difficile de comprendre comment l'intoxication tétanique continue à évoluer chez l'animal ayant reçu de l'antitoxine et dont le sang est devenu préventif et antitoxique. Les récentes recherches de Roux et Borrel ont fait la lumière sur le mode d'action de l'antitoxine et donné un nouvel essor à la sérothérapie du tétanos.

Un mélange neutre de toxine et d'antitoxine est inoffensif pour les cellules nerveuses, il peut être injecté sans inconvénient dans le cerveau du lapin. Or un lapin immunisé par le sérum, non influencé quand on lui injecte sous la peau des doses de toxine cinq fois mortelles pour l'animal neuf, succombe à une dose de $0^{cc},1$ de

(1) Cette dose, quand on l'injecte sous la peau, est absolument sans action sur un lapin neuf.

toxine inoculée dans le cerveau. Cependant son sang est tellement antitoxique qu'à la dose de quelques gouttes il neutralise des doses considérables de toxine; bien plus, une trace de ce sang accidentellement épanchée sur le trajet intracérébral de l'aiguille d'inoculation suffit à neutraliser la toxine injectée et l'animal échappe à la mort.

L'antitoxine injectée sous la peau ou dans le sang des animaux reste dans le sang, elle n'a pas d'affinité pour les éléments nerveux; ceux-ci, au contraire, extraient et fixent la toxine (Voy. plus haut). Chez un animal tétanique le sérum injecté sous la peau ou dans le sang limite l'intoxication en détruisant le poison circulant, mais il ne vient pas au contact de la toxine déjà fixée par les éléments nerveux, toxine qui va diffuser de cellule à cellule en étendant ses ravages. Ce n'est donc pas dans le sang des tétaniques qu'il faudra introduire l'antitoxine, mais bien dans les centres nerveux. La démonstration de la justesse de ces vues est fournie par les résultats de l'injection directe d'antitoxine dans le cerveau (1).

Roux et Borrel prennent un lot de cobayes auxquels ils inoculent sous la peau une dose mortelle de toxine ; au bout de vingt-quatre heures ces animaux présentent des symptômes de tétanos. A quelques-uns d'entre eux on injecte alors un centimètre cube de sérum antitoxique sous la peau : la mort survient néanmoins. Aux autres, au contraire, on donne 4 gouttes du même sérum dans chaque hémisphère cérébral : le tétanos s'arrête et tous les animaux guérissent, mais ils peuvent garder longtemps des contractures localisées ; c'est que, en effet, l'injection a protégé les parties supérieures de la moelle contre la diffusion du poison, mais est restée inefficace vis-à-vis des lésions accomplies, d'où persistance des contractures existant lors de l'inoculation thérapeutique. De plus, quand la partie supérieure de la moelle est atteinte, l'injection arrive trop tard, elle ne sauve plus l'animal.

La guérison du tétanos humain semble devoir être la conséquence de ces recherches; à l'heure actuelle il faut s'en tenir aux conclusions de Roux et Borrel : « Quelques gouttes de sérum antitétanique dans le cerveau guérissent mieux le tétanos que de grandes quantités introduites dans le sang ou sous la peau. »

(1) L'injection d'antitoxine dans la moelle épinière est très malaisée à pratiquer sans produire de lésions et ne semble pas avoir l'efficacité de l'injection intracérébrale.

CHAPITRE XIX

LE BACILLE DE LA FIÈVRE TYPHOÏDE

L'agent de la fièvre typhoïde a été découvert par Eberth dans la rate, les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer des typhoïdiques. Gaffky a déterminé les caractères morphologiques du Bacille d'Eberth.

Chez les typhoïdiques, on rencontre constamment le Bacille d'Eberth dans la rate, le foie, les ganglions mésentériques et les follicules clos de l'intestin, moins fréquemment dans les poumons, les méninges, le testicule, les amygdales.

Chantemesse et Vidal, Karlinski, etc., pensaient que le Bacille d'Eberth ne passe dans les matières fécales que lorsque les ulcérations des plaques de Peyer sont établies, c'est-à-dire vers le dixième ou douzième jour de la fièvre typhoïde. Les récentes recherches de Remy prouvent que le bacille se trouve dans le contenu de l'intestin dès le troisième jour de la maladie, le nombre des bacilles augmente jusqu'à la fin du deuxième septénaire, puis il diminue progressivement, si bien qu'après le quatrième septénaire les recherches donnent d'ordinaire des résultats négatifs ; parfois cependant on trouve encore de rares colonies de Bacilles d'Eberth au quarante-deuxième et au quarante-cinquième jour.

Mais dans les fèces le Bacille d'Eberth se trouve mélangé à de nombreux saprophytes ; sa recherche et son isolement sont très délicats et nécessitent l'emploi de procédés spéciaux que nous étudierons plus loin ; aussi la plupart des anciens observateurs avaient-ils échoué à déceler le bacille dans les fèces ; les travaux récents montrent que le peu de succès de leurs recherches tenait à l'insuffisance de leur technique.

Le Bacille d'Eberth ne passe pas dans le sang, dans les conditions ordinaires ; les ensemencements de quantités notables de sang typhoïdique prélevé pendant la vie ou après la mort restent stériles (Chantemesse et Widal, Besson). Fraenkel et Simmonds, dans un grand nombre d'ensemencements de sang, n'ont obtenu qu'une fois une seule colonie du bacille spécifique ; dans dix-huit cas de fièvre grave compliquée d'hémorragies diverses, de suppurations, etc., des ensemencements de sang pratiqués aux différentes périodes par Besson sont toujours demeurés stériles.

Dans le sang prélevé au niveau des taches rosées, Neuhauss aurait rencontré neuf fois sur quinze le Bacille d'Eberth, et pour lui les taches seraient dues à des embolies bacillaires. Ces résultats obtenus par Neuhauss n'ont pas été confirmés. Besson, ayant ensemencé le sang prélevé au niveau de

cinquante-quatre taches rosées sur dix-neuf malades, n'a obtenu qu'une fois une culture de Bacille typhique.

Le Bacille d'Eberth est susceptible de passer dans l'urine des typhoïdiques (Bouchard, Leitz, Neumann). Besson a recherché le Bacille d'Eberth dans les urines de trente-trois typhoïdiques : il conclut que le Bacille d'Eberth apparaît dans les urines uniquement lorsque celles-ci sont albumineuses; le bacille se rencontre dans 40 p. 100 des urines contenant de l'albumine en quantité égale ou supérieure à un gramme par litre ; il disparaît de l'urine en même temps que l'albumine.

Le Bacille d'Eberth se rencontre dans un grand nombre des complications de la fièvre typhoïde : c'est ainsi qu'il cause des angines (Chantemesse, Besson). le laryngo-typhus (Besson), des broncho-pneumonies et des suppurations diverses : abcès profonds, ostéites, adénites, méningites, pleurésies, péricardites, etc. (Roux et Vinay, Gilbert et Girode, Kelch, Kamen, Orloff, Ivan Honl, Besson, etc.).

Le Bacille typhique aurait été rencontré par Remlinger et Schneider dans les matières fécales d'un certain nombre de sujets (5 fois sur 10 recherches) atteints d'affections autres que la fièvre typhoïde ; des recherches analogues entreprises par Courmont et par Remy sont demeurées négatives.

Le Bacille d'Eberth a été fréquemment rencontré dans les eaux et dans des échantillons de glace destinée à l'alimentation ; sa recherche dans l'eau de boisson est de rigueur quand on se trouve en présence d'une épidémie de fièvre typhoïde. De même on a pu déceler le Bacille typhique dans le sol, dans les poussières de chambrées où s'étaient produits des cas de fièvre typhoïde, etc. Celli, Sternberg, Howard ont attiré l'attention sur le rôle des mouches dans la propagation de la fièvre typhoïde.

On ne connaît pas d'affection spontanée causée par le Bacille d'Eberth chez les animaux.

Le Bacille d'Eberth présente de grandes analogies avec le *Bacterium coli*, hôte habituel de l'intestin de l'homme et des animaux. Se basant sur ces analogies, Rodet et J. Roux (de Lyon) ont voulu identifier les deux bacilles ; à l'heure actuelle, s'il faut reconnaître que le Colibacille et le Bacille d'Eberth possèdent des caractères propres, on doit admettre qu'ils constituent deux espèces très voisines et dont la différenciation est souvent fort délicate.

Article I. — FIÈVRE TYPHOÏDE EXPÉRIMENTALE.

§ 1er. — RÉCEPTIVITÉ, SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

Les inoculations de cultures de laboratoire ne fournissent que des résultats douteux. Sanarelli, Chantemesse et Widal ont pu, par l'inoculation intrapéritonéale de virus exalté, conférer à certains animaux une septicémie rappelant de très loin la maladie humaine ;

l'infection par les voies digestives, malaisée à obtenir, reproduit chez l'animal une véritable fièvre typhoïde expérimentale.

A. **Virus non exalté.** — Les cultures des laboratoires sont le plus souvent inactives, même quand elles proviennent de semence prise directement dans la rate d'un typhoïdique; cependant elles tuent parfois la souris et le cobaye par injection intrapéritonéale.

La souris peut succomber en vingt-quatre heures à l'inoculation intrapéritonéale d'un centimètre cube de culture récente en bouillon, le cobaye meurt parfois en quarante-huit à soixante-douze heures de septicémie à la suite de l'injection de 1 à 2 centimètres cubes de culture dans le péritoine.

Injectées sous la peau, les cultures amènent exceptionnellement la mort; d'ordinaire il se forme un petit abcès au point d'inoculation et l'animal guérit rapidement.

B. **Virus exalté.** — Sanarelli et Chantemesse et Widal sont parvenus à exalter la virulence du Bacille typhique; leurs virus exaltés permettent d'obtenir à coup sûr la septicémie éberthique chez les animaux de laboratoire.

Exaltation du virus. — *a.* Sanarelli inocule dans le tissu cellulaire d'un cobaye 5 centimètres cubes d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon d'un Bacille typhique inactif, en même temps qu'il injecte dans le péritoine 10 à 12 centimètres cubes d'une culture en bouillon de *Bacterium coli* ancienne et stérilisée; le cobaye meurt en douze à vingt-quatre heures et à l'autopsie on trouve le Bacille typhique en abondance dans le péritoine et parfois aussi dans la rate et le sang.

On ensemence en bouillon un peu de la sérosité péritonéale de ce premier cobaye; la culture inoculée à la dose de 5 centimètres cubes sous la peau d'un second cobaye le tue à la condition qu'on injecte en même temps dans le péritoine 7 à 8 centimètres cubes de culture stérilisée de *Bacterium coli*. En continuant ainsi les passages, on diminue par degrés la quantité de culture stérilisée de *Bacterium coli* et, au bout de peu de temps, on obtient un bacille capable de produire à lui seul l'infection typhique chez le lapin et le cobaye quand on l'injecte à la dose de 5 centimètres cubes dans le péritoine.

Sanarelli est arrivé aux mêmes résultats en associant au Bacille typhique des cultures stérilisées de *Proteus vulgaris*, des cultures stérilisées de matières fécales ou une infusion de viande vieille d'un mois et stérilisée à 120°. La simple ingestion de petites quantités de cette infusion a permis, chez le cobaye, la généralisation d'un virus typhique complètement atténué.

Quand on possède un virus capable de tuer le cobaye à haute dose, on peut en achever l'exaltation par des passages successifs dans le

péritoine des cobayes. On injecte d'abord 2 à 3 centimètres cubes de sérosité péritonéale riche en bacilles ; puis, à mesure que le virus s'exalte, les animaux succombant plus vite et l'exsudat péritonéal diminuant, la quantité à injecter se réduit progressivement à $0^{cc},5$ et $0^{cc},1$; après quinze à vingt passages, il suffit d'une seule goutte pour tuer un cobaye adulte en douze à quatorze heures. A partir du trentième passage, le virus ne semble plus susceptible de s'exalter davantage, il est fixé : la culture de vingt-quatre heures en bouillon tue les animaux sensibles à la dose de quelques gouttes dans le péritoine, mais l'inoculation sous-cutanée exige des doses plus fortes : 1 à 4 centimètres cubes pour le lapin et le cobaye, $0^{cc},5$ pour la souris.

b. Chantemesse et Widal exaltent également la virulence d'un bacille moyennement actif par les passages successifs chez le cobaye. Pour conférer la virulence à un bacille non pathogène, ils utilisent la découverte de Vincent relative à l'exaltation du Bacille d'Eberth par son association au Streptocoque pyogène ; ils inoculent en même temps, dans le tissu cellulaire du cobaye, 4 centimètres cubes de la culture du Bacille d'Eberth, et, dans le péritoine, 8 à 10 centimètres cubes d'une culture de Streptocoque stérilisée par chauffage à 100° pendant une heure. L'animal succombe en moins de vingt-quatre heures avec généralisation du Bacille d'Eberth ; on pratique des passages successifs en diminuant progressivement la dose de culture stérilisée de Streptocoque, et bientôt le Bacille typhique est suffisamment virulent pour entraîner la mort à la dose de quelques gouttes injectées dans le péritoine.

Infection par les virus exaltés. — Le cobaye est l'animal de choix pour l'étude de l'infection typhique ; nous décrirons comme type la maladie que produit chez le cobaye l'injection intrapéritonéale de quelques gouttes de virus exalté.

Deux à quatre heures après l'inoculation, la température centrale s'élève et peut atteindre 40° et 41°, mais bientôt (sixième à douzième heure) elle s'abaisse progressivement jusqu'à 36° et même 32° ; avec l'hypothermie apparaît le collapsus et l'animal succombe quinze à trente heures après l'inoculation. Pendant la période fébrile, l'animal est triste, ne mange pas ; quand arrive l'hypothermie, il se pelotonne dans un coin de la cage, son poil se hérisse, l'abdomen devient douloureux, le moindre attouchement provoque des cris ; en même temps un amaigrissement rapide se manifeste.

A l'autopsie, la cavité péritonéale renferme une quantité variable (d'autant moins grande que le virus était plus actif) de sérosité louche très riche en bacilles ; la rate, le foie et les reins sont tumé-

fiés, congestionnés ; l'intestin est congestionné et contient un liquide séreux, riche en Bacilles typhiques d'après Chantemesse et Widal, absolument dépourvu de Bacilles typhiques et ne renfermant qu'un *Bacterium coli* très virulent, d'après Sanarelli. Les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques sont tuméfiés ; parfois il existe un léger épanchement dans les cavités pleurales.

Le bacille se rencontre en culture pure dans l'exsudat péritonéal et aussi dans les organes, le sang, etc. On peut constater sa présence dans les coupes des plaques de Peyer, de la rate, etc.

Infection par les voies digestives. — *Singe.* — Chantemesse et Ramond préparent un singe macaque en le soumettant pendant quinze jours au régime lacté exclusif, puis lui font ingérer une culture sur gélose mélangée à de la confiture. Dès le troisième jour, l'animal présente de la fièvre, de l'anorexie et de la diarrhée ; il succombe après environ une semaine. L'autopsie montre, particulièrement au niveau des plaques de Peyer, les lésions caractéristiques de la fièvre typhoïde.

Lapin. — Remlinger dit avoir contaminé le lapin en lui faisant ingérer, après deux à trois jours de diète, des légumes souillés de cultures virulentes, pendant cinq à dix jours. Beaucoup d'animaux n'ont pas souffert de ce régime ; quelques-uns ont présenté, vers la fin de la première semaine, de la fièvre, de l'amaigrissement, de la diarrhée et ont succombé ; l'autopsie décelait des ulcérations des plaques de Peyer, de la tuméfaction de la rate, etc. Le Bacille typhique se rencontrait en culture pure dans la rate.

Chantemesse et Ramond diminuent d'abord la résistance de l'animal en lui injectant dans le péritoine du bouillon stérile additionné de 50 gouttes de laudanum ; un quart d'heure après, ils portent dans l'estomac avec une sonde (Voy. *Technique*, p. 188) 5 centimètres cubes d'une culture récente de Bacille typhique en bouillon. Les animaux ainsi traités présentent une véritable fièvre typhoïde avec lésions caractéristiques ; le séro-diagnostic est positif. Les animaux qui ont reçu pendant vingt jours une injection quotidienne de sérum ou d'urine humains sont plus sensibles au Bacille typhique.

§ 2. — RECHERCHE DU BACILLE TYPHIQUE DANS L'ORGANISME.

On recherche le Bacille typhique dans l'organisme des malades atteints de fièvre typhoïde et le cadavre des individus ou animaux ayant succombé à l'infection.

Fréquemment aussi on se propose de déceler le Bacille d'Eberth dans les eaux, les poussières, les matières fécales, etc. Ces deux sortes de recherches

sont très différentes : quand le Bacille typhique se trouve à l'état pur dans une humeur, un organe, la recherche en est aisée ; il en est tout autrement quand le Bacille typhique est associé à d'autres germes et particulièrement au *Bacterium coli*.

Nous étudierons dans un chapitre spécial les procédés de recherche du Bacille typhique dans l'eau, les fèces, etc. (Voy. p. 453); pour le moment nous n'envisagerons que le cas le plus simple, celui où le Bacille typhique est présumé exister à l'état pur dans une humeur ou un organe.

1° **Examen microscopique.** — Porte sur la pulpe splénique recueillie sur le cadavre, les fragments de divers viscères, le pus des suppurations typhoïdiques, les exsudats de la maladie expérimentale, etc. *Il ne permet en aucun cas de poser un diagnostic ferme.*

a. *Lamelles et frottis.* — Seront colorés au bleu de méthylène ou à la thionine phéniqués. Faire l'épreuve du Gram qui devra rester négative.

Les frottis de rate contiennent souvent peu de bacilles ; pour obtenir de belles préparations, on peut, après avoir lavé la rate entière avec la solution de sublimé au millième, l'envelopper dans un linge imbibé de la même solution et la placer pendant vingt-quatre heures à l'étuve à 37° (Cornil) ou aspirer de la pulpe splénique dans des pipettes Pasteur qui sont également mises à l'étuve (Gasser).

Les frottis préparés avec la rate ainsi traitée sont très riches en bacilles. Gasser conseille de les colorer d'abord par le Gram, puis de faire agir la fuchsine de Ziehl diluée : les Bacilles typhiques et le fond sont colorés en rouge ; s'il existe en même temps des microbes prenant le Gram, ils sont colorés en violet.

b. *Coupes.* — Les organes fixés à l'alcool ou au sublimé acide sont inclus dans la paraffine. Les coupes sont colorées par les procédés applicables aux microbes ne prenant pas le Gram, et de préférence par le procédé de Nicolle au tannin (Voy. p. 226).

2° **Cultures.** — Ensemencer en bouillon, sur gélose et sur plaques de gélatine (isolement) la pulpe splénique, les exsudats, les produits de la ponction de l'amygdale, de la rate, l'urine recueillie aseptiquement, etc. Pour la recherche dans les crachats, il est d'ordinaire indispensable de pratiquer l'isolement par un des procédés exposés au chapitre XXI.

On fera subir aux cultures toutes les épreuves que nous indiquons page 460 pour identifier le Bacille typhique.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Bacille typhique se présente dans l'organisme sous l'aspect de petits bâtonnets ayant en moyenne 2 à 3 μ de longueur et 0,6 à 0,7 μ

de largeur ; mais ses dimensions varient beaucoup dans les cultures.

Dans le bouillon, le bacille est plus grêle et plus court; dans les vieilles cultures sur gélatine, il s'allonge et donne des formes filamenteuses ; sur gélose et sur pomme de terre, son diamètre transversal augmente aux dépens du diamètre longitudinal et il prend un aspect trapu.

Les bâtonnets sont isolés ou réunis par deux; dans les jeunes cultures ils prennent fréquemment l'aspect de diplocoques.



Fig. 202. — Bacille typhique. — Culture en bouillon. — Thionine phéniquée (Reich. ; Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Les extrémités du Bacille typhique sont arrondies ; son protoplasma est homogène ; parfois cependant, dans les cultures anciennes, on voit, après coloration, des bacilles légèrement renflés vers le centre et présentant à ce niveau un espace clair plus ou moins étendu, c'est la *forme en navette* décrite par Artaud. Cet espace clair dépend d'une dégénérescence partielle du bacille; il ne correspond pas à une spore, pas plus d'ailleurs que les renflements terminaux que l'on observe dans certaines cultures (Gaffki, Chantemesse et Widal) et qui ne sont que des formes de dégénérescence.

En règle, le Bacille typhique est *très mobile*, il se déplace rapidement dans le champ du microscope par des mouvements rappelant ceux du poisson dans l'eau, mais il existe des races de Bacilles typhiques qui présentent une mobilité très atténuée. Les mouvements sont dus à des cils vibratiles (Voy. plus loin).

Quand on porte avec une öse une trace d'une culture sur milieux solides dans une goutte d'eau, cette culture s'y dissocie très rapidement et la goutte d'eau louchit instantanément (Chantemesse).

Coloration. — Le Bacille d'Eberth se colore aisément par les couleurs basiques d'aniline ; il ne prend pas le Gram. Pour la coloration des coupes et des frottis, tous les procédés applicables aux microbes ne prenant pas le Gram peuvent être utilisés ; nous recommandons le procédé de Nicolle au tannin.

Coloration des cils. — Les cils du Bacille d'Eberth se colorent aisément à l'aide d'une des méthodes spéciales que nous avons exposées dans la première partie de cet ouvrage (ch. IX), mais les

meilleurs résultats seront obtenus avec le procédé de Van Ermengen que nous préférons à tout autre, ou encore avec le procédé de Nicolle.

Sur les préparations colorées on se rend compte aisément du nombre et de la disposition des cils. Chaque bacille possède en général huit à douze cils, mais il n'est pas rare de rencontrer des individus porteurs de dix-huit à vingt-quatre flagella; dans les préparations on voit toujours des cils isolés qui ont été séparés des bacilles pendant les manipulations.



Fig. 203. — Cils du Bacille d'Eberth. — Méthode de coloration de Nicolle (Reich. ; Obj. 1/12 imm.; Oc. IV).

Le mode d'implantation des flagella est régulier ; ils sont répartis sur toute la surface du bacille ; rarement ils sont disposés en bouquets, encore cet aspect dépend-il probablement d'un phénomène d'entraînement par le liquide ambiant. Souvent les bacilles sont réunis en amas et agglutinés entre eux par une gangue qui présente la même coloration que les cils eux-mêmes ; c'est sur cette gangue que paraissent s'implanter les cils.

La longueur des cils est variable ; Remy et Sugg leur attribuent en moyenne 6 à 8 μ, mais on trouve des cils beaucoup plus longs.

Les cils sont flexueux et présentent trois à huit ondulations.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Bacille d'Eberth est facultativement aérobie, il cultive sur tous les milieux ordinairement employés. Il se développe à de très basses températures : la culture commence d'après Seitz à + 4°. La température optima est comprise entre 30° et 37°, mais le développement se produit jusqu'à 46° (Rodet et G. Roux). Les cultures ne répandent aucune odeur.

Bouillon. — A 37°, dès la huitième ou douzième heure le bouillon présente un léger trouble qui s'accentue par la suite ; la culture prend alors un aspect caractéristique : en l'examinant par transparence on voit à l'intérieur du bouillon des ondes moirées que rend apparentes une légère agitation ; puis il se forme des flocons blanchâtres qui ne tardent pas à se déposer au fond du tube en y consti-

tuant un sédiment assez abondant. A la longue le liquide s'éclaircit et prend une coloration brunâtre.

Gélatine. — Le Bacille typhique ne liquéfie pas la gélatine.

Piqûre. — A 18°-20°, la culture commence dès le deuxième jour; le long de la piqûre apparaissent de petites colonies arrondies, confluentes, blanc jaunâtre; à la surface il se forme un disque mince, transparent, à bords irisés, assez étendu, ou une tache épaisse, opaque, de dimensions très restreintes. La culture reste toujours grêle.

Strie sur gélatine inclinée. — Le long de la strie apparaît un voile mince, transparent, à reflets irisés, à bords irréguliers, restant grêle et cessant de s'accroître dès la fin de la première semaine. C'est là la culture classique, mais parfois il se produit le long de la strie une bandelette étroite, opaque, blanc jaunâtre et épaisse.

Il apparaît parfois dans la gélatine des cristaux allongés, simulant des arborescences et dus à la précipitation des phosphates.



Fig. 204. — Aspect d'une colonie du Bacille typhique en culture sur plaque après cinq jours. D'après une photographie 60/1.

Colonies isolées. — Les colonies isolées sur plaque de gélatine présentent souvent, mais non constamment, un aspect caractéristique. Vers la quarante-huitième heure, à 20°, apparaissent de petites colonies circulaires qui ne tardent pas à acquérir le diamètre d'une tête d'épingle, mais restent toujours minces, de teinte blanc bleuâtre, nacrées, transparentes; bientôt les bords de chaque colonie se découpent, deviennent sinueux, en même temps qu'apparaissent des sillons et des crêtes qui parcourent la colonie de la périphérie au centre, lequel devient plus épais que les bords. Ces détails sont bien apparents quand on examine la colonie à la loupe, on a alors un aspect tout spécial que les auteurs allemands ont comparé à celui d'une montagne de glace. Les colonies atteignent au maximum les dimensions d'une lentille.

Les colonies développées dans la profondeur de la gélatine, et même parfois celles de la surface, ont un aspect tout autre; elles restent régulièrement arrondies, deviennent opaques, transparentes et conservent les dimensions d'une tête d'épingle.

Gélose. Sérum solidifié. — La culture n'a rien de caractéristique; dès le premier jour, à 37°, apparaît une strie blanchâtre qui s'épaissit par la suite et prend un aspect crémeux. La culture est plus abondante sur gélose glycérinée.

Pomme de terre. — Le plus souvent le Bacille typhique donne sur pomme de terre une culture caractéristique : il ne se produit à première vue aucun développement apparent, mais en regardant à jour frisant la surface de la pomme de terre, on aperçoit le long de la strie un léger enduit humide, vernissé, rappelant le glacis de sucre que l'on met sur certains gâteaux; quelquefois la culture prend par la suite une légère teinte bistre.

Dans certains cas, au contraire, il se produit à la surface de la pomme de terre une couche bien visible d'aspect jaunâtre et quelquefois même franchement brunâtre. D'après Buchner, cet aspect des cultures s'obtiendrait à volonté en alcalinisant au préalable les pommes de terre dans une solution de carbonate de soude.

Milieu de Remy et Sugg. — Pour obvier aux inconvénients liés aux variations de la composition chimique de la pomme de terre, Remy et Sugg ont proposé un milieu artificiel dans lequel entrent les substances constituant la pomme de terre. Sur ce milieu le Bacille d'Eberth donne constamment, d'après ces auteurs, une culture caractéristique : « un enduit limité, festonné, absolument incolore ».

On obtient de la manière suivante le milieu de Remy et Sugg :

1° Préparer une solution :

Eau	1 000 centimètres cubes.
Glycose	20 grammes.
Peptone	5 —
Asparagine	5 —
Acide citrique	0gr,75
Phosphate neutre de potassium.	5 grammes.
Sulfate de magnésium	2gr,50
Sulfate de potassium	2gr,50
Chlorure de sodium	1gr,25
Carbonate de sodium	Q.S. pour alcalinité légère.

2° A 100 centimètres cubes de la solution obtenue, ajouter :

Gélatine extra	10 grammes.
Magnésie calcinée	2 —

Répartir en tubes, stériliser, incliner les tubes pendant le refroidissement ; pratiquer les ensemencements en strie.

Lait. — Le Bacille typhique se développe dans le lait sans jamais le coaguler.

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Les difficultés que présente la différenciation du Bacille d'Eberth et du *Bacterium coli* ont rendu nécessaire l'étude approfondie de leurs propriétés biologiques, les caractères morphologiques ne pouvant fournir à eux seuls des bases solides pour la détermination.

§ 1er. — RÉACTIONS BIOCHIMIQUES.

Action sur les sucres. — Le Bacille typhique attaque sensiblement la glycose, a une faible action sur la lévulose et la galactose, mais ne fait pas fermenter la saccharose ni la lactose. Il n'exerce également aucune action fermentative vis-à-vis de la mannite.

Ces propriétés du Bacille typhique, mises en lumière de la manière suivante, fournissent des données précieuses pour le diagnostic :

a. *Ensemencement dans un tube de bouillon lactosé additionné d'un peu de carbonate de chaux* (Voy. p. 33) : il ne se dégage jamais de bulles de gaz, quelle que soit la durée du séjour à l'étuve.

b. *Ensemencement sur gélatine lactosée ou mannitée additionnée de tournesol* (Voy. p. 59) : le Bacille d'Eberth n'attaquant pas la lactose, il n'y a pas production d'acides et la gélatine garde sa teinte bleue (Voy. aussi *Bacterium coli*).

c. *Ensemencement dans le lait :* il ne se produit pas de coagulation; si l'on a ajouté au lait de la teinture de tournesol, celle-ci garde sa teinte bleue.

d. *Ensemencement dans le petit-lait :* la lactose n'est pas attaquée ; il peut se produire une légère acidité du milieu; en aucun cas cette acidité ne dépasse 3 p. 100 de solution décinormale de soude.

Nous verrons que dans les mêmes conditions le Colibacille produit des réactions tout autres ; il est important de remarquer que, pour l'établissement du diagnostic, les milieux fermentescibles ne doivent jamais être à base de glycose, cette substance fermentant légèrement sous l'influence du Bacille d'Eberth.

Absence de production d'indol. — Le Bacille typhique ne produit jamais d'indol dans les cultures.

Recherche de l'indol. — Pour rechercher l'indol, il faut ensemencer le microbe à étudier dans une solution de peptone, et non dans le bouillon ordinaire; on utilise la solution suivante :

Eau........................	100 centimètres cubes.
Peptone Witte ou Chapoteau..	3 grammes.
Chlorure de sodium...........	0gr,5 à 1 gramme.

Répartir en tubes à raison d'environ 15 centimètres cubes par tube et stériliser à l'autoclave.

Au bout de deux à huit jours, la culture devra être soumise à une des épreuves suivantes :

a. Ajouter à un tube de culture en solution de peptone, un centimètre cube d'une solution de nitrite de potassium à 0,02 p. 100, puis lentement, un centimètre cube d'acide sulfurique chimiquement pur

dilué au quart. Si la culture contient de l'indol, il se produit une teinte rose (*Réaction de Salkowski*).

b. Ajouter au tube de culture 5 à 10 gouttes d'une solution de nitro-prussiate de soude à 5 p. 100, puis quelques gouttes de lessive de soude à 30 p. 100 : il se produit une coloration brune ; au bout de quelques instants, faire tomber dans le tube 10 à 15 gouttes d'acide acétique cristallisable : si la culture contient de l'indol, il se développe une teinte bleue caractéristique; la teinte bleue n'apparaît souvent qu'au bout d'un certain temps (*Réaction de Weyl-Legal*).

c. Ajouter au tube de culture quelques gouttes d'acide acétique cristallisable, puis 2 à 3 centimètres cubes d'alcool-éther; agiter, puis laisser reposer et décanter l'éther que l'on fait évaporer dans une petite capsule de porcelaine. Après évaporation ajouter au résidu 1 à 2 gouttes de la solution de nitrite de potassium à 0,02 p. 100 et quelques gouttes d'acide sulfurique pur. Ce procédé est très sensible, la moindre trace d'indol se révèle par une teinte rosée (*Réaction de Nencki*).

Cultures en milieux minéraux. — Nœgeli, Laurent, Beyerinck, Péré, Maasse, etc., ont donné la formule d'un certain nombre de milieux minéraux sur lesquels le développement du Bacille d'Eberth est tardif et insignifiant, tandis que les bactéries voisines avec lesquelles on est exposé à le confondre y cultivent abondamment.

Il ne convient pas d'attacher une trop grande importance à ce caractère, mais il a cependant une constance suffisante pour que le développement nul ou tardif dans un des milieux indiqués par Nœgeli, Maasse, etc., constitue un bon signe d'identification du Bacille d'Eberth. On utilisera de préférence le milieu suivant (Remy et Sugg) :

Eau distillée........................	1 000	grammes.
Glycose..............................	20	—
Nitrate de sodium....................	10	—
Phosphate neutre de potassium.......	1	gramme.
Sulfate de magnésium................	2	grammes.
Chlorure de calcium..................	1	gramme.

Inaptitude au développement sur les milieux vaccinés. — Chantemesse et Widal ont mis en lumière une propriété curieuse du Bacille typhique : si on racle avec une öse la surface d'une culture de ce bacille sur gélatine ou gélose, de manière à débarrasser le milieu de culture des colonies qui le recouvraient, les ensemencements pratiqués sur ce milieu avec du bacille nouveau ne donnent lieu à aucun développement, la gélatine ou la gélose restent stériles, elles ont été *comme vaccinées* par la première culture. Malheureusement ce phénomène manque parfois et ne saurait constituer à lui seul un élément certain de diagnostic.

Cultures sur milieux colorés. — D'Abundo, Nœggerath, Gasser ont insisté sur la propriété que possède le Bacille typhique de décolorer en se développant les milieux additionnés de certaines matières colorantes.

Le milieu de Nœggerath (Voy. p. 59) a été recommandé par son auteur, puis par Deschamps et Grancher, pour la diagnose du Bacille typhique : sur les plaques de gélatine colorée par le liquide de Nœggerath, le Bacille typhique ensemencé en strie donne une culture violet-évêque, tandis que le milieu se décolore aux alentours.

Gasser a reconnu que le milieu de Nœggerath donne des résultats incertains et a proposé de le remplacer par la gélose fuchsinée (Voy. p. 59) : sur cette gélose à 37°-39°, au bout de deux jours, la culture du Bacille d'Eberth a pris une teinte rouge, tandis que le milieu s'est décoloré.

Ainsi que l'ont montré Holz, Dunbar, Remy et Sugg, etc., les résultats fournis par ces cultures ne sont pas constants et ne peuvent servir à caractériser le Bacille typhique.

Culture en bouillon arsenical. — Thoinot et G. Brouardel voient que le Bacille typhique ne se développe pas dans le bouillon contenant 0gr,02 d'acide arsénieux par litre ; au contraire, le *Bacterium coli* pousse dans ces conditions et même quand le bouillon contient 1 à 2 grammes d'acide arsénieux par litre.

Culture sur artichaut. — D'après Roger, le Bacille d'Eberth ne donne, sur artichaut, aucune culture apparente et n'entraîne aucun changement de coloration du milieu ; dans les mêmes conditions, le *Bacterium coli* donne une culture jaunâtre épaisse et colore l'artichaut en vert intense.

Technique. — Enlever les feuilles de l'artichaut, laisser le foin adhérer au fond et couper celui-ci en petits cubes à l'aide d'un couteau à lame d'argent. Introduire les cubes, le foin en haut, dans des tubes à pomme de terre dont l'ampoule inférieure contient quelques gouttes d'eau ; boucher à l'ouate. Stériliser à 115°. Ensemencer à l'union du foin et du fond.

§ 2. — VARIABILITÉ DES CILS.

Remy et Sugg ont montré que l'action de la lumière solaire, des antiseptiques à petites doses, et des températures dysgénésiques était à peu près sans influence sur le nombre et la forme des cils. Quand le Bacille typhique a été cultivé pendant plusieurs semaines au contact du *Bacterium coli*, ses cils sont parfois difficiles à colorer (Remy).

La variabilité morphologique en ce qui concerne les cils est donc au moins très limitée ; c'est là une constatation importante en raison de ses applications au diagnostic du Bacille typhique.

§ 3. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Vitalité. — Le Bacille typhique, pris dans les cultures, succombe quand on l'expose à une température de + 60° pendant dix à vingt minutes; il résiste à des températures très basses; Prudden l'a retrouvé vivant dans un bloc de glace maintenu pendant trois mois entre — 1° et — 11°; mais les alternatives de congélation et de liquéfaction le tuent rapidement.

Dans l'eau le Bacille typhique conserve longtemps sa vitalité (Straus et Dubarry, Chantemesse et Widal); dans l'eau stérile on peut le retrouver vivant au bout de trois mois; quand l'eau contient des microbes saprophytes, la disparition du Bacille typhique est plus rapide, mais on peut encore le retrouver après un mois (Hueppe).

Dans le sol le bacille peut rester vivant pendant cinq mois et demi (Grancher et Deschamps); la dessiccation ne le fait périr qu'après un ou deux mois (Uffelmann).

L'action de la lumière tue rapidement le Bacille typhique (Gaillard, Janowsky) : des cultures exposées au soleil, au mois de mai, ont été trouvées stériles au bout de quatre à huit heures; les rayons bleus, violets, ultra-violets agissent plus énergiquement que les rayons rouges ou infra-rouges (Vincent). Étendues et desséchées sur des morceaux de toile, les cultures sont stérilisées par une exposition de neuf à vingt-six heures aux rayons solaires (Vincent).

Le Bacille typhique est très sensible aux antiseptiques; les solutions usuelles de sublimé, de phénol, etc., le tuent en quelques minutes.

Virulence. — A propos de la fièvre typhoïde expérimentale nous avons insisté sur la grande variabilité de la virulence du Bacille d'Eberth et nous avons exposé les moyens qui permettent d'exalter cette virulence.

§ 4. — LA TOXINE TYPHIQUE.

Brieger a recherché le premier la présence de substances toxiques dans les cultures du Bacille d'Eberth; il en a extrait une ptomaïne (typhotoxine) possédant des propriétés toxiques énergiques. On sait aujourd'hui que les ptomaïnes de Brieger ne sont que les produits de décomposition des substances albuminoïdes sous l'influence des traitements chimiques que cet auteur faisait subir aux cultures.

Brieger et Fraenkel filtrent des cultures de Bacille typhique, les concentrent dans le vide au tiers de leur volume, puis les précipitent par dix fois leur volume d'alcool acidulé par quelques gouttes d'acide acétique. Le précipité obtenu est dissous dans l'eau; la dissolution est saturée de sulfate

d'ammoniaque et soumise à la dialyse ; il reste sur le dialyseur une substance albuminoïde assez faiblement toxique, active surtout vis-à-vis du lapin qu'elle tue en quelques jours sans lésions appréciables.

Dans les recherches récentes on a renoncé à isoler des cultures typhiques un produit chimiquement déterminé et on a étudié la toxine brute telle qu'on la rencontre dans les bouillons où a cultivé le Bacille d'Eberth (Sanarelli, Chantemesse, Lépine et Lyonnet).

I. **Toxine de Sanarelli.** — **Préparation.** — Sanarelli utilise le virus exalté par les passages successifs dans le péritoine des cobayes (Voy. p. 418). Le bacille est ensemencé dans du bouillon glycériné à 2 p. 100; la culture est maintenue à l'étuve à 37° pendant un mois, puis on la stérilise par le chauffage et on la laisse en repos pendant huit mois à la température ordinaire ; au bout de ce temps le ballon qui contient la culture est scellé à la lampe et porté pendant quelques jours à 60°. Pendant ces longues macérations la toxine contenue dans le corps des microbes diffuse dans le liquide de culture ; ce liquide décanté avec soin constitue la toxine de Sanarelli.

Action sur les animaux. — *Lapin.* — Cette toxine, injectée sous la peau, tue le lapin de 700 à 1 000 grammes à la dose de 10 centimètres cubes par kilogramme d'animal.

Peu après l'injection, la respiration devient plus fréquente, puis l'animal chancelle, une parésie générale se manifeste progressivement et vers la sixième ou douzième heure surviennent des accès convulsifs qui aboutissent à la mort.

La température, qui au début s'était élevée d'un dixième de degré environ, ne tarde pas à s'abaisser au-dessous de la normale ; la mort survient en hypothermie. Les effets de la toxine varient d'un animal à l'autre, souvent la mort ne survient qu'au bout de quelques jours et est précédée d'une période cachectique (amaigrissement, diarrhée, etc.). — A l'autopsie on trouve de l'anémie des organes abdominaux ; il n'existe ni congestion de la muqueuse intestinale, ni tuméfaction des plaques de Peyer.

Souris. — Elle succombe d'ordinaire à l'injection sous-cutanée de un centimètre cube de toxine ; la mort arrive en quelques heures ; à l'autopsie on constate une légère hyperémie des viscères abdominaux, de la tuméfaction de la rate et un léger épanchement stérile dans le péritoine. — L'inoculation intrapéritonéale est plus sévère ; la dose mortelle minima est alors de 0,2 centimètre cube.

Cobaye. — Le cobaye est un excellent réactif pour la toxine typhique ; la dose mortelle minima est de 1,5 centimètre cube par 100 grammes du poids du corps, par la voie sous-cutanée. L'inoculation intrapéritonéale est moins sûre.

L'inoculation sous-cutanée de 4 à 5 centimètres cubes de toxine par 100 grammes du poids de l'animal amène la mort en 15 à 20 heures.

Dès le moment de l'injection, la température s'abaisse progressivement jusqu'à la mort; environ une heure après l'injection apparaît une forte météorisation abdominale accompagnée d'une vive sensibilité douloureuse : l'animal se tient immobile, ramassé sur lui-même, il pousse des cris dès qu'on le touche; au bout de quatre à cinq heures, il est accablé, tient les yeux mi-clos et est en proie à un tremblement presque continuel; le ventre est météorisé, très sensible; il peut se produire de la diarrhée parfois hémorragique; enfin apparaît la paralysie, le météorisme disparaît et la mort survient.

A l'autopsie, on trouve dans la cavité péritonéale une quantité plus ou moins grande d'un exsudat riche en leucocytes et souvent trouble; la rate est tuméfiée, congestionnée, friable; les parois de l'intestin grêle sont dilatées, amincies et complètement infiltrées de sang; la surface de la muqueuse est rouge et les plaques lymphatiques sont infiltrées et congestionnées. L'estomac, les capsules surrénales sont le siège de congestions intenses et de taches ecchymotiques; l'intestin est rempli par un liquide diarrhéique contenant en culture pure du *Bacterium coli* très virulent.

Singe. — Est très sensible à la toxine typhique; la marche et les lésions de l'intoxication sont les mêmes que chez le cobaye.

II. **Toxine de Chantemesse**. — **Préparation.** — Chantemesse cultive son bacille exalté dans une macération de moelle osseuse ou une solution de peptone de rate (1). Le maximum de toxicité des cultures est atteint le cinquième ou sixième jour à 37°; c'est à ce moment que les cultures doivent être filtrées sur porcelaine.

Propriétés. — La toxine de Chantemesse est plus active que celle de Sanarelli. Elle est très fragile; sa toxicité est diminuée par le chauffage à 100° pendant quelques minutes. L'air et la lumière l'altèrent rapidement : on ne peut la conserver qu'en tubes exactement remplis, scellés à la lampe et placés dans l'obscurité.

Un centimètre cube de toxine injecté dans le péritoine tue en douze à vingt-quatre heures 80 grammes de cobaye (6 centimètres cubes environ pour un cobaye de 500 grammes). La souris est très sensible, le lapin un peu moins que le cobaye.

§ 5. — IMMUNITÉ.

I. — Beumer et Peipper immunisent des souris blanches en leur inoculant à plusieurs reprises pendant plusieurs jours de suite des doses croissantes de cultures vivantes.

II. — Brieger, Wassermann et Kitasato appliquent à l'immunisa-

(1) Chantemesse prépare sa macération en faisant infuser à froid de la rate et de la moelle osseuse dans de l'eau distillée; après filtration sur porcelaine, on ajoute un peu de sang humain défibriné.

La solution de peptone de rate s'obtient en faisant digérer une rate et un estomac de porc dans de l'eau acidulée (Voy. *Peptone de Martin*); neutraliser et stériliser.

Cultiver dans de larges matras en couche mince.

tion contre le Bacille d'Eberth leur procédé d'atténuation des germes par les cultures en bouillon de thymus (Voy. p. 33 et 391). Des inoculations d'une culture de bacille virulent en bouillon de thymus, chauffée à 60°, immunisent le cobaye et la souris.

Brieger, Wassermann et Kitasato obtiennent encore l'immunisation du cobaye par un autre procédé ; des cultures virulentes sont chauffées à 80°-90°, évaporées au dixième et précipitées par l'alcool. Le précipité obtenu est desséché dans le vide ; inoculé au cobaye à la dose de 2 centigrammes, il lui confère l'immunité. Chantemesse et Widal ont trouvé cette méthode fort infidèle.

III. — Sanarelli, Chantemesse et Widal, Beumer et Peipper confèrent l'immunité aux animaux en leur injectant des cultures stérilisées par la chaleur.

1° Sanarelli cultive le bacille exalté en bouillon peptonisé; les cultures, stérilisées à 120° après une semaine de séjour à 37°, possèdent des propriétés vaccinantes.

En général, pour immuniser des cobayes de 400 grammes, il suffit de leur injecter 16 à 18 centimètres cubes de cultures stérilisées, en plusieurs fois pendant une période de cinq jours ; l'immunité est acquise à partir du quatrième jour après la dernière injection et les cobayes résistent aux inoculations de virus exalté. Pendant la durée de l'immunisation les animaux présentent un certain amaigrissement, mais ils reviennent ensuite rapidement a l'état normal.

Le lapin est beaucoup plus sensible que le cobaye : l'immunisation en est très laborieuse et la mort survient souvent au cours du traitement; les animaux qui survivent se montrent solidement immunisés.

2° Chantemesse et Widal utilisent une culture en bouillon laissée à 37° pendant quinze jours et stérilisée à 100°.

Seize à vingt centimètres cubes sont nécessaires pour immuniser le cobaye; il convient de les injecter en quatre doses en mettant quelques jours entre chaque injection. La durée totale de l'immunisation est de quinze jours, puis, au bout de huit jours, on peut pratiquer l'inoculation d'épreuve (2 centimètres cubes de culture virulente dans le péritoine). Assez souvent les animaux succombent au cours de l'immunisation ou lors de l'inoculation d'épreuve.

L'immunisation du lapin se pratique de la même façon, mais est encore plus délicate.

Beumer et Pfeiffer obtiennent de la même façon l'immunisation du mouton en utilisant des cultures chauffées une heure à 60°.

3° Chantemesse immunise le cheval en lui injectant des quantités croissantes de sa toxine (Voy. plus haut).

L'animal réagit énergiquement au poison typhique, l'immunisation est très pénible, les injections pratiquées sous la peau ou dans les veines doivent être fréquemment suspendues par suite de la réaction violente que présente le sujet ; il faut plusieurs années pour obtenir une immunité solide.

§ 6. — SÉROTHÉRAPIE.

Brieger, Wassermann et Kitasato ont montré que l'on peut immuniser les souris contre l'infection typhique expérimentale en leur injectant du sérum prélevé chez un animal vacciné. Sanarelli, Chantemesse et Widal, Beumer et Peipper ont poursuivi l'étude de la sérothérapie de la fièvre typhoïde.

Le sang des lapins, cobayes et moutons immunisés, recueilli quelques jours après l'inoculation d'épreuve, donne un sérum doué de propriétés préventives et curatives.

L'inoculation dans le péritoine ou sous la peau du cobaye d'une dose mortelle de culture typhique mélangée à 0,5 centimètre cube de ce sérum reste absolument inoffensive.

Le cobaye est immunisé en quelques heures par une injection de 2 centimètres cubes du sérum d'un animal vacciné, il résiste alors à l'inoculation de doses sûrement mortelles de virus typhique exalté.

De même on peut sauver les animaux inoculés avec une dose mortelle de culture en leur injectant dans les trois heures qui suivent l'inoculation une dose de 1 à 2 centimètres cubes de sérum antityphique.

Le sérum de cheval obtenu par Chantemesse, injecté au cobaye à la dose d'un cinquantième de centimètre cube, vingt-quatre heures avant l'inoculation d'une dose mortelle de virus, le protège contre l'infection.

Chantemesse et Widal ont montré que le sérum provenant d'hommes atteints, convalescents ou guéris de la fièvre typhoïde possède des propriétés préventives et curatives, susceptibles de persister plusieurs années après la guérison de la maladie. Pour manifester ces propriétés, ce sérum doit être injecté à des doses plus fortes que le sérum des animaux immunisés (2 à 10 centimètres cubes) ; le sérum d'hommes n'ayant jamais eu la fièvre typhoïde ne possède pas ces propriétés (sauf une exception citée par Chantemesse et Widal).

Applications thérapeutiques. — On a tenté chez l'homme le traitement de la fièvre typhoïde au moyen du sérum d'animaux immunisés ou de typhoïdiques guéris ou en convalescence (Cesaris-Demel, Orlandi, Börger, Chantemesse et Widal, etc.). Les résultats obtenus sont favorables, mais non encore probants.

Propriété agglutinante. — Sanarelli a montré que le sérum antityphique ne possède aucune propriété bactéricide ni antitoxique. Ce sérum possède par contre une propriété remarquable, mise en lumière par Durham et Grüber et étudiée par Widal : la *propriété agglutinante.* — Quand on ajoute à une culture récente de Bacille typhique en bouillon une petite quantité de sérum provenant

d'un animal immunisé ou d'un homme atteint ou convalescent de fièvre typhoïde (Widal), les bacilles épars dans le bouillon perdent leur mobilité, se groupent en amas, s'agglutinent en petits paquets, tout en conservant d'ailleurs leur vitalité. — Chez le typhoïdique, la propriété agglutinante se rencontre encore dans la sérosité des vésicatoires, le lait, les larmes (non provoquées) et moins fréquemment dans l'urine, le pus, la bile, etc. (Widal).

Widal a utilisé la présence de la propriété agglutinante dans le sang des typhoïdiques pour établir un procédé rapide et concluant de diagnostic de la fièvre typhoïde : le *séro-diagnostic*.

Le phénomène de l'agglutination n'est pas lié à la vie des bacilles ; il peut être obtenu avec des cultures tuées. Kraus, Ch. Nicolle ont montré que les cultures filtrées sur porcelaine et additionnées de sérum antityphique présentent encore le phénomène de l'agglutination : il se précipite des amas granuleux analogues aux amas microbiens. L'agglutination est donc la coagulation d'une *substance agglutinable* qui, d'abord contenue dans le corps des microbes, passe en diffusant dans le bouillon et les liquides de macération.

La substance agglutinable est très résistante à la chaleur, au froid, à la lumière, aux antiseptiques. Elle est soluble dans l'eau, les liquides alcalins ou acides, l'éther et l'alcool absolu. Elle n'est en rapport ni avec la virulence, ni avec la toxicité des cultures employées; la présence du pouvoir agglutinant dans le sang n'est un signe ni d'intoxication, ni d'infection ; il trahit simplement le passage dans l'organisme de la substance agglutinable spécifique.

Beaucoup de microbes sont agglutinés par le sérum spécifique ; d'autres ne préparent pas de substance agglutinable ; l'agglutination n'a rien de commun avec le *pouvoir bactéricide* des sérums ; ce pouvoir bactéricide est détruit à 60°, le *pouvoir agglutinant* résiste comme la substance agglutinable (Nicolle).

Certaines substances chimiques possèdent le pouvoir agglutinant (Malvoz), mais leur action n'a rien de spécifique et s'exerce sur différents microbes (Beco) ; le mélange à parties égales de formol du commerce, d'eau oxygénée, de solution à 1 p. 1 000 de safranine ou de vésuvine, etc., produisent l'agglutination du Bacille d'Eberth et de diverses bactéries.

§ 7. — SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA FIÈVRE TYPHOÏDE.

D'ordinaire, la propriété agglutinante apparaît dans le sang des typhoïdiques dès les premiers jours de la maladie ; assez souvent cette apparition est retardée ; elle ne manque que par exception (une fois sur 163 cas de Widal et Sicard, deux fois sur 98 cas que nous avons étudiés). Elle peut disparaître pendant les premières semaines de la convalescence ; elle manque d'ordinaire au bout de six à huit mois, mais a pu être observée après trois et sept ans.

Une réaction positive obtenue selon les règles que nous allons indiquer constitue un signe de certitude de la fièvre typhoïde (1) ; un

(1) Il faut toujours penser à la possibilité d'une fièvre typhoïde antérieure ayant laissé après elle la propriété agglutinante. Dans trois ou quatre observations on a observé l'agglu-

résultat négatif obtenu avec le sang d'un malade suspect fournit seulement une probabilité contre le diagnostic de fièvre typhoïde, surtout si la recherche a été pratiquée pendant les premiers jours de la maladie; l'examen doit alors être répété les jours suivants; la probabilité est d'autant plus grande que l'examen a été fait à une période plus avancée de la maladie.

La réaction agglutinante peut être mise en évidence par plusieurs procédés *lents* ou *rapides*, mais quel que soit le procédé employé on devra toujours se conformer aux règles suivantes :

1° Le sang destiné à l'examen est recueilli purement, soit par ponction d'une veine du pli du coude (Voy. p. 193), soit plus simplement par piqûre de la pulpe du doigt à la lancette (Voy. p. 192); le sang est reçu dans un petit tube de verre stérilisé.

2° Pour les examens à distance, le sang peut être envoyé dans le tube de verre où on l'a recueilli, bouché avec un bouchon flambé ; mais, la dessiccation n'altérant pas la propriété agglutinante dans le sang, il est plus simple, pour les envois à un laboratoire éloigné, de recueillir quelques gouttes de sang sur un morceau de papier ou une lame de verre et de l'y laisser dessécher. Pour utiliser le sang desséché, on le dissout dans une ou deux gouttes d'eau stérile. Dans de nombreux cas où nous l'avons employé, ce dernier procédé nous a toujours donné de bons résultats; le sang séché sur lame de verre nous a paru plus actif que celui qui était desséché sur papier. Le sang desséché ne peut être utilisé que pour le séro-diagnostic par le procédé extemporané.

3° Au moment de l'usage, il faut toujours s'assurer par un examen microscopique que la culture que l'on emploie pour le séro-diagnostic est pure : on conçoit les erreurs qui pourraient résulter de l'usage d'une culture impure.

4° Avoir soin de toujours verser le sérum dans la culture et non de faire tomber les gouttes de culture dans le sérum.

I. **Procédé lent**. — Ce procédé exige l'emploi d'un sérum rigoureusement pur : le sang recueilli par ponction d'une veine du pli du coude est abandonné au repos dans un tube stérile jusqu'à séparation du caillot, puis on aspire le sérum dans une pipette Pasteur.

a. A un tube contenant 6 à 10 centimètres cubes de bouillon stérile on ajoute une dizaine de gouttes du sérum à examiner et on ensemence avec une trace d'une culture typhique ; on a toujours soin d'ensemencer en même temps, comme témoin, un tube de bouillon simple; les tubes sont placés à l'étuve à 37°. — On note un

tination chez des malades atteints d'affections non typhiques; nous-mêmes l'avons obtenue dans un cas de pneumonie franche chez un jeune homme, sans qu'on pût soupçonner une dothiénentérie ancienne.

léger retard de la culture dans le tube additionné de sérum, puis au bout d'une huitaine d'heures on y voit apparaître de légers grumeaux ; vers la dix-huitième heure l'aspect devient caractéristique : les microbes sont réunis au fond du tube en petits flocons blanchâtres et le bouillon reste absolument clair; les grumeaux ne se laissent pas dissocier par agitation du tube. Au contraire, dans le tube témoin le bouillon est trouble et présente les ondes miroitantes caractéristiques de la culture du Bacille d'Eberth.

La réaction n'est pas toujours aussi nette : parfois le bouillon, au lieu de rester clair, présente un trouble irrégulier, sans ondes, et dû à la précipitation d'une très fine poussière dont chaque grain, examiné au microscope. est une agglomération de microbes. Quelquefois aussi la réaction est d'abord caractéristique, puis, au bout de dix-huit à vingt-quatre heures, le bouillon se trouble au-dessus du précipité. *L'examen à l'œil nu doit toujours être complété par l'examen microscopique* qui décèle les amas de petites dimensions et permet de reconnaître la structure de ces amas.

b. On peut encore ajouter le sérum à une culture typhique en bouillon âgée de vingt-quatre à trente-six heures ; le mélange est placé à l'étuve à 37°. Quand la propriété agglutinante du sérum est considérable, au bout de quelques heures la culture devient grumeleuse et s'éclaircit rapidement en même temps que se précipitent au fond du tube les amas bacillaires; quand le sérum est peu actif, il se forme des grumeaux, mais la clarification n'est jamais complète. Toujours il est nécessaire de confirmer par l'examen microscopique les observations faites à l'œil nu.

II. **Procédé extemporané**. — Ce procédé est le plus rapide et le plus sensible; de plus il n'exige que quelques gouttes de sang recueilli par piqûre du doigt. C'est donc à lui que l'on devra s'adresser dans la plupart des cas.

Il exige l'emploi d'une culture âgée de un à deux jours. Le plus grand soin doit être apporté dans le choix de cette culture ; il est essentiel qu'elle soit pure et il est indispensable qu'elle soit récente, car, dans les cultures anciennes, il se forme de faux amas qui fausseraient les résultats de l'opération. Ces faux amas existent parfois même dans les cultures âgées de vingt-quatre heures : *il est nécessaire de toujours examiner au microscope la culture au moment de l'employer*. Rejeter toute culture dans laquelle il existerait des amas de bacilles. Pour se mettre à l'abri de toute cause d'erreur, on aspire dans une pipette Pasteur une quantité de culture suffisante pour pratiquer la recherche, on en porte une trace sur une lame et on l'examine au microscope ; le reste du contenu de la pipette sert immédiatement à faire le séro-diagnostic.

On peut utiliser pour le séro-diagnostic le sang total, mais ce procédé plus rapide en apparence ne l'est pas en réalité, car il faut attendre avant de pratiquer l'examen microscopique que la plupart des globules rouges se soient déposés au fond du vase contenant le mélange de sang et de culture, la présence de nombreux globules nuisant à la netteté de l'agglutination.

On conduira la recherche de la façon suivante :

A. *Réaction avec le sérum.* — Dans un petit verre conique on fait tomber 10 à 100 gouttes de la culture du Bacille d'Eberth et on y ajoute une goutte du sérum à éprouver. On porte de suite une goutte du mélange sur une lame, on recouvre d'une lamelle et on examine avec l'objectif 8 ou 9; quand le sérum possède la propriété agglutinante on peut voir de suite des amas de bacilles agglutinés et, entre ces amas, des bacilles libres plus ou moins nombreux. La réaction est encore plus nette si on examine la préparation au bout de quinze à vingt minutes : on aperçoit de nombreux îlots compacts formés par les bacilles agglomérés. L'aspect est caractéristique et rend toute erreur impossible. — L'agglutination est favorisée par une légère dessiccation de la périphérie de la goutte entre la lame et la lamelle ; elle est beaucoup plus nette au bout de quelques minutes et, dans les cas où le sérum ne possède qu'une activité minime, elle peut n'apparaître qu'après quarante à soixante minutes.

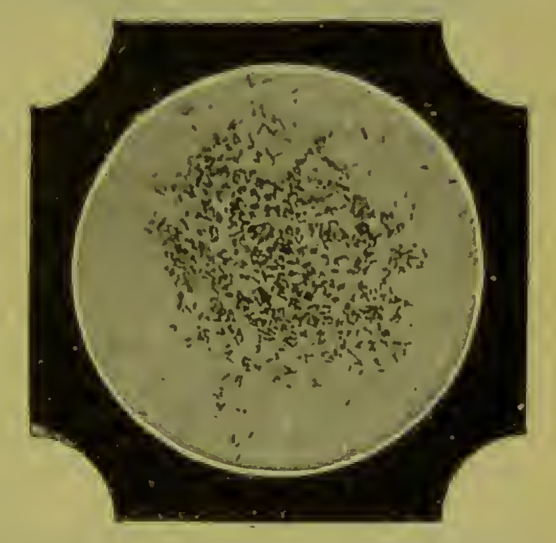


Fig. 205. — Séro-diagnostic de la fièvre typhoïde. Procédé de J.-H. Guillemin (1). Grossissement : 700/1.

On peut colorer la préparation pour rendre les amas plus visibles ; le procédé indiqué par Guillemin donne de bons résultats :

Mélanger une goutte de sang entier avec 9 gouttes de bouillon stérile ; ajouter une goutte du mélange à 2 à 5 gouttes de la culture typhique. Étaler sur une lame une grosse goutte de la dilution ; placer à la chambre humide pendant une à deux heures ; dessécher lentement, fixer par l'alcool-éther ; traiter par la solution d'acide acétique à 1 p. 10 pour dissoudre les hématies ; laver, colorer au Ziehl, laver, sécher, monter dans le baume.

B. *Réaction avec le sang desséché.* — Le sang desséché, comme nous l'avons dit plus haut, est dissous au moment de l'emploi dans 1 à 2 gouttes d'eau ; cette solution est versée dans un verre conique

(1) Cliché Ch. Basset de La Rochelle.

contenant 10 à 50 gouttes de culture en bouillon. On laisse reposer un instant pour permettre la séparation des globules rouges qui gêneraient l'observation et on pratique l'examen comme dans le cas précédent.

C. *Réaction avec le bacille mort.* — Le phénomène de l'agglutination n'est pas lié à une réaction vitale des bacilles : il apparaît quand on fait usage de cultures tuées. De ce fait on peut tirer une application utile au séro-diagnostic : on n'a pas toujours sous la main une culture récente de Bacille typhique ; avant de pratiquer l'examen il faut réensemencer une culture ancienne et perdre par conséquent une douzaine d'heures. Aussi y a-t-il parfois avantage à se servir d'une culture tuée, l'expérience ayant montré qu'une telle culture garde pendant plusieurs semaines sa sensibilité vis-à-vis du sérum agglutinant. Le procédé suivant est à recommander (Widal et Sicard) :



Fig. 206. — Séro-diagnostic de la fièvre typhoïde ; réaction avec le sang complet. 1000/1.

A une culture typhique âgée de seize à vingt-quatre heures et ayant subi l'épreuve de l'examen microscopique, on ajoute un peu de formol du commerce (à raison de 2 gouttes de formol pour 15 centimètres cubes de culture) ; les bacilles sont tués, restent « comme embaumés » et gardent intégralement pendant plusieurs semaines l'aptitude à l'agglutination. On a soin de couvrir le tampon d'ouate du tube contenant la culture avec un capuchon de caoutchouc ; on peut ainsi conserver au laboratoire des cultures tuées de la même façon que l'on garde un réactif chimique. Au moment du besoin on agite légèrement le tube pour répartir uniformément les microbes dans le bouillon et on mêle à quelques gouttes de cette culture morte une goutte de sérum, en opérant comme il a été dit plus haut.

Mensuration du pouvoir agglutinatif. — Le pouvoir agglutinatif existe à un degré variable dans le sérum des typhoïdiques ; tantôt il est très faible, tantôt au contraire il est tellement énergique que la formation des amas se produit encore dans les dilutions supérieures à 1/5000e, et à 1/12000e.

La recherche de la propriété agglutinante devra toujours commencer par l'examen de la dilution au dixième ; au-dessous de cette dilution la constatation de l'agglutination laisserait place au doute

(Voy. *Bacterium coli*); mais il ne suffit pas de faire cette seule épreuve : on doit mesurer plus exactement l'intensité du pouvoir agglutinatif en le recherchant dans des dilutions au vingtième, au trentième, etc.

En pratique, quand on dispose d'une faible quantité de sang, on pourra se contenter de deux épreuves, l'une avec le mélange au dixième, l'autre avec une dilution au cinquantième.

Widal et Sicard distinguent :

Le pouvoir agglutinatif très faible........	Inférieur à 1/100.
— faible........	De 1/100 à 1/200.
— moyen.......	De 1/200 à 1/500.
— intense......	De 1/500 à 1/2 000.
— très intense..	Supérieur à 1/2 000.

Remarque. — Dans ces mensurations il importe que les gouttes de culture et de sérum mélangées soient égales entre elles ; on obtient une précision suffisante par le procédé suivant : On prend un tube de verre d'environ 20 centimètres de long et on en bouche les deux extrémités à l'ouate ; on étire la partie moyenne à la lampe, comme pour la préparation des pipettes de Pasteur, mais sans séparer les deux pipettes obtenues ; on stérilise le tube ainsi préparé et au moment du besoin on coupe la partie effilée en son milieu : on obtient ainsi deux pipettes donnant des gouttes sensiblement égales, l'une sert pour la culture, l'autre pour le sérum.

Au point de vue du pronostic, il ne semble point que l'intensité du pouvoir agglutinatif puisse fournir des renseignements certains sur la gravité de l'affection ; parfois ce pouvoir est très marqué dans les cas de fièvre sévère, mais ce n'est pas là un fait constant.

APPLICATION A LA DIAGNOSE DU BACILLE D'EBERTH.

L'application de la réaction d'agglutination au diagnostic du Bacille d'Eberth est susceptible de rendre de grands services, mais ne saurait dans tous les cas trancher la question si délicate de l'identification de ce bacille.

Pour le diagnostic du bacille il faut utiliser, de préférence au sérum antityphique expérimental, du sérum de typhoïdique agglutinant nettement au centième. Les Bacilles d'Eberth typiques sont agglutinés par ce sérum à des dilutions variant de 1 p. 50 à 1 p. 100; les *Bacterium coli*, au contraire, ne sont jamais agglutinés ou seulement dans des dilutions de 1 p. 5 à 1 p. 10. Ainsi posé, le diagnostic est très aisé : *tout bacille agglutiné dans les dilutions à* 1 p. 50 *est un Bacille d'Eberth légitime.*

Malheureusement il est prouvé aujourd'hui que tous les Bacilles typhiques légitimes ne sont pas susceptibles d'être agglutinés dans ces conditions : Remy a montré qu'un Bacille typhique bien agglutinable perdait aisément cette propriété par la vie en commun pen-

dant quelques semaines avec le *Bacterium coli. Il peut exister des Bacilles d'Eberth authentiques non agglutinables par le sérum typhoïdique.*

En cas de résultats négatifs de la séro-réaction, on peut essayer de la façon suivante l'identification du bacille suspect : pendant quinze jours on injecte tous les deux jours à un cobaye 2 centimètres cubes d'une culture en bouillon âgée de quarante-huit heures du bacille à déterminer. On peut affirmer la nature typhique du bacille si le sang du cobaye ainsi préparé agglutine un Bacille typhique authentique au titre minimum de 1 p. 40. Certains échantillons de Bacilles typhiques authentiques échappent encore à ce mode de détermination (Remy).

LE BACILLE DE LA PSITTACOSE.

On désigne sous le nom de *psittacose* une maladie infectieuse des perruches et des perroquets, transmissible à l'homme. Nocard a étudié et décrit l'agent de cette maladie, c'est un bacille qui présente de grandes analogies avec le Bacille d'Eberth.

La psittacose est transmise de l'animal à l'homme, soit par le gavage de bouche à bec, soit par le contact des plumes de l'animal souillées par les déjections, ou des cages ayant contenu des perruches malades. La maladie est transmissible de l'homme à l'homme.

Le Bacille de la psittacose se rencontre dans la moelle osseuse et le sang des perruches malades (Nocard). On ne l'a trouvé encore qu'une seule fois chez l'homme ayant succombé à la psittacose (Gilbert et Fournier), il existait en culture pure dans le sang du cœur. Jamais il n'a été rencontré dans les crachats, l'urine, le sang, les sérosités, chez les sujets vivants.

D'autre part, Achard et Bensaude auraient rencontré le Bacille de Nocard chez deux sujets atteints d'affections autres que la psittacose (abcès sterno-claviculaire, cystite purulente) et Gilbert et Fournier ont isolé du contenu intestinal de perruches bien portantes un microbe analogue à celui de Nocard. En présence de ces faits, on peut encore émettre quelques doutes sur la spécificité du Bacille de Nocard, au moins en ce qui concerne l'affection humaine.

Psittacose expérimentale.

Les perroquets et les perruches sont très sensibles au Bacille de Nocard ; ils succombent en quelques jours à l'inoculation, après avoir présenté les symptômes suivants : l'animal se tient immobile, ramassé sur lui-même, les plumes hérissées, les ailes pendantes, il ne mange pas, est en état de somnolence continuelle et est atteint de diarrhée.

Il en est de même de la souris, du lapin et du pigeon ; le cobaye est beaucoup plus résistant.

Caractères morphologiques.

Aspect microscopique. — Le Bacille de Nocard est morphologiquement analogue au Bacille d'Eberth ; c'est un petit bâtonnet à bouts arrondis, très mobile, possédant dix à douze cils ; on ne lui connaît pas de spores.

Il se colore aisément par les couleurs basiques, mais ne prend pas le Gram.

Cultures. — Les conditions de culture sont les mêmes que celles du Bacille d'Eberth; les caractères des cultures sont très analogues pour les deux bacilles.

Bouillon. — A 37°, trouble très rapide, abondant, avec formation d'une très légère pellicule à la surface.

Gélatine. — Cultures un peu plus abondantes que celles du Bacille d'Eberth, très analogues à celles du *Bacterium coli.*

Gélose. — Mêmes caractères que le Bacille typhique.

Pomme de terre. — Culture ordinairement épaisse, brunâtre, analogue à celle du *Bacterium coli* type.

Lait. — Pas de coagulation.

Propriétés biologiques.

Le Bacille de Nocard ne fait pas fermenter les sucres et ne coagule pas le lait. Il ne produit pas d'indol dans l'eau peptonisée. Il pousse dans les bouillons phéniqués et se développe lentement sur le milieu ioduré d'Elsner.

Il pousse sur les cultures raclées de Bacille d'Eberth (Voy. p. 427). Il est agglutiné légèrement par le sérum typhique; cette agglutination est toujours minime (Gilbert et Fournier) et bien moins prononcée que celle du Bacille typhique: la différence d'aptitude à l'agglutination peut servir à différencier les deux microbes (Widal et Sicard), la dose minima d'un sérum susceptible d'agglutiner le Bacille typhique est sans action sur le Bacille de Nocard.

Le sérum des individus atteints de psittacose semble dépourvu de pouvoir agglutinant vis-à-vis du Bacille de Nocard (Gilbert et Fournier, Achard et Bensaude).

Recherche et diagnostic.

Le Bacille de Nocard sera recherché par les méthodes que nous avons exposées à propos du Bacille typhique.

Le développement sur les cultures de Bacille typhique raclées, l'aspect de la culture sur pomme de terre, l'action pathogène sur les oiseaux, le peu d'aptitude à l'agglutination par le sérum typhique fourniront les bases du diagnostic différentiel.

CHAPITRE XX

LE BACTERIUM COLI

Le *Bacterium coli* a été décrit pour la première fois par Escherich. Il présente de grandes analogies avec le Bacille typhique avec lequel l'École lyonnaise a voulu le confondre. Pour si ressemblants que soient les deux microbes, il existe entre eux des différences telles que leur identification ne saurait être admise.

Il n'entre pas dans le cadre de cet ouvrage de reprendre les arguments des partisans et des adversaires de l'identification ; dans l'état actuel de nos connaissances on doit distinguer le *Bacterium coli* du Bacille d'Eberth : le chapitre suivant sera consacré en partie à ce diagnostic différentiel.

Chez l'homme et les animaux le Colibacille se rencontre à l'état normal dans le tube intestinal, où il apparaît dès les premières heures qui suivent la naissance.

Dans l'intestin de l'enfant il existe à peu près pur à côté du Bacille lactique ; chez l'homme sain, il se trouve associé à de nombreux microbes. Souvent peu virulent dans l'intestin normal, le *Bacterium coli* est susceptible de passer à une virulence extrême dans un grand nombre d'affections, dans tous les états fébriles, la fièvre typhoïde, la plupart des maladies intestinales, etc. (Lesage, Sanarelli, etc.).

Le *Bacterium coli*, devenu virulent, peut être l'agent d'un grand nombre de maladies humaines.

Il cause des entérites, certains cas de diarrhée cholériforme, de choléra infantile, etc. ; on l'a accusé, probablement à tort, d'être l'agent de la dysenterie ; il cause des péritonites (péritonites par perforation, péritonites de l'étranglement herniaire, péritonites sans perforation) ; pénétrant dans les voies biliaires, il détermine des angiocholites suppurées et peut-être des ictères infectieux. Il détermine certaines angines, des broncho-pneumonies, endocardites, péricardites, méningites, etc. ; il est l'agent d'un certain nombre d'infections urinaires, on doit l'identifier à la bactérie urinaire de Clado. Chez la femme il joue un grand rôle dans les affections du petit bassin (salpingites, métrites, etc.). Enfin il cause un bon nombre de complications de la fièvre typhoïde.

On trouve le *Bacterium coli* dans le sol, les eaux souillées par les déjections animales, les poussières, etc.

Article I. — COLIBACILLOSE EXPÉRIMENTALE.

§ 1er. — RÉCEPTIVITÉ, SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

Le Colibacille est pathogène pour le cobaye, le lapin, la souris, etc.; mais les divers échantillons de bacille présentent une virulence très variable et quelquefois nulle ; dans les matières fécales des sujets sains le *Bacterium coli* est souvent inactif.

On se procure aisément du Colibacille virulent en pratiquant une suture de l'anus chez le cobaye : l'animal succombe à l'obstruction intestinale et son péritoine renferme un épanchement louche contenant en culture pure un *Bacterium coli* très actif (1).

Quelques passages par le péritoine du cobaye exaltent rapidement la virulence du *Bacterium coli*.

L'inoculation sous-cutanée d'un bacille peu actif amène d'ordinaire le développement d'un abcès et l'animal guérit ; l'inoculation intrapéritonéale est plus grave.

L'inoculation d'un bacille virulent donne lieu aux phénomènes suivants :

Cobaye. — Animal de choix pour l'étude de la colibacillose.

Inoculation intrapéritonéale. — Quelques gouttes d'une culture en bouillon injectées dans le péritoine tuent le cobaye en dix-huit ou vingt-quatre heures, avec des symptômes de péritonite suraiguë et de l'hypothermie. A l'autopsie, on trouve une péritonite généralisée avec un exsudat louche abondant; les anses intestinales sont couvertes de membranes fibrino-purulentes ; l'intestin est rempli par des matières diarrhéiques, ses parois sont tuméfiées, congestionnées et présentent parfois des ecchymoses sous-muqueuses ; les plaques de Peyer sont tuméfiées et desquamées; la rate est hypertrophiée ; chez les femelles les *genitalia* sont congestionnés, il n'est pas rare de voir l'utérus rempli par un exsudat hémorragique. Le Bacille d'Escherich se trouve dans le sang et les viscères.

Inoculation intrapleurale. — La mort survient en vingt-quatre heures; à l'autopsie il existe une pleurésie parfois hémorragique, avec dépôts fibrineux sur les poumons, un épanchement péricardique, de la congestion des poumons et de l'intestin et de la tumé-

(1) Quelquefois dans cet exsudat le *Bacterium coli* se trouve mélangé à un petit nombre d'autres microbes dont on le sépare facilement en pratiquant un isolement sur plaques de gélatine.

faction de la rate. Le bacille se trouve dans le sang et les organes.

Inoculation sous-cutanée. — Moins sévère que les précédentes, elle exige des doses plus considérables de culture pour entraîner la mort (1 à 2 centimètres cubes). Dans ce cas il se produit un phlegmon au point d'inoculation, le bacille se généralise et la mort survient en trente-six ou quarante-huit heures. A l'autopsie on constate la tuméfaction des plaques de Peyer et de la rate, de la congestion et des ecchymoses de l'intestin.

Souris. — La souris, moins sensible, succombe à l'inoculation du Colibacille avec les mêmes lésions que le cobaye.

Lapin. — Le lapin est un peu moins sensible que le cobaye. Les inoculations intrapéritonéale, intrapleurale et sous-cutanée exigent des doses plus fortes pour entraîner la mort (mêmes lésions que chez le cobaye).

Quand la dose inoculée a été faible, le lapin ne succombe qu'au bout de quelques jours et présente des foyers de suppuration dans les ganglions mésentériques, le foie et la rate.

L'inoculation intraveineuse tue très rapidement le lapin en produisant une septicémie colibacillaire avec les lésions ordinaires du côté de l'intestin et de la rate.

Dans certains cas, après l'inoculation intraveineuse de quelques gouttes de culture en bouillon, le lapin ne succombe pas rapidement ; la survie peut être de plusieurs mois et l'animal présente une paralysie atrophique liée à une *polyomyélite antérieure* signalée pour la première fois par Gilbert et Lion ; le lapin ne succombe pas fatalement à cette affection médullaire, on a pu observer des cas de guérison même quand l'animal présentait des symptômes très accentués.

§ 2. — RECHERCHE DU COLIBACILLE DANS L'ORGANISME.

La recherche du Colibacille dans les exsudats, tissus, etc., sera pratiquée suivant la méthode que nous avons exposée à propos du Bacille d'Eberth (1) ; on fera subir aux cultures obtenues toutes les épreuves de différenciation que nous indiquons au chapitre XXI.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Bacille d'Escherich, comme le Bacille d'Eberth, est un petit bâtonnet à bouts arrondis ; chez les deux microbes la taille est iden-

(1) Les procédés de recherche dans les fèces, les eaux, etc., seront exposés au chapitre XXI.

tique et sujette aux mêmes variations. Les formes en navette, les pseudo-spores se rencontrent chez le *Bacterium coli*.

Coloration. — Le Bacille d'Escherich se colore comme le Bacille d'Eberth et ne prend pas le Gram.

Mobilité et cils vibratiles. — Le *Bacterium coli* est en général moins mobile que le Bacille typhique ; la mobilité est du reste très variable pour les bacilles de différentes provenances; certains échantillons sont immobiles, chez d'autres les mouvements sont lents et peu étendus, enfin certaines races ont une mobilité voisine de celle du Bacille typhique.

Fig. 207. — *Bacterium coli*. — Culture en bouillon. — Thionine phéniquée (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Les *cils* du *Bacterium coli* ne ressemblent que de très loin à ceux du Bacille d'Eberth ; on les colore par les mêmes procédés, mais l'opération est plus difficile à réussir.

Le nombre des cils du *Bacterium coli* est toujours inférieur à celui des cils du Bacille typhique ; on ne compte guère que quatre à six flagella par bacille, le chiffre de douze est absolument exceptionnel.



Fig. 208. — Cils du *Bacterium coli*. — Coloration par la méthode de Nicolle (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. IV).

Les cils peuvent s'implanter sur toute la surface du bacille ; plus souvent ils sont disposés en un ou deux bouquets insérés sur un point quelconque du corps du bacille, mais de préférence vers une extrémité. Ils sont deux à trois fois moins longs que les flagella du Bacille d'Eberth ; leur longueur ne dépasse guère 3 à 5 μ ; ils sont aussi moins flexueux, moins ondulés; jamais, dans les préparations, on n'observe les broussailles de cils enchevêtrés si caractéristiques du Bacille d'Eberth.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Elles sont les mêmes pour le Bacille d'Eberth et le *Bacterium coli*; la propriété de cultiver à 45° appartient aux deux microbes. Le développement du Colibacille est toujours un peu plus rapide que celui du Bacille d'Eberth ensemencé dans les mêmes conditions. Les cultures du *Bacterium coli* répandent une odeur fade, fécaloïde, caractéristique.

Bouillon. — A 37°, le développement est apparent dès la sixième ou la huitième heure; les caractères de la culture sont les mêmes que pour le Bacille typhique, cependant il se forme fréquemment à la surface du liquide une pellicule grisâtre que l'on n'observe qu'exceptionnellement avec le Bacille d'Eberth.

Gélatine. — Le *Bacterium coli* ne liquéfie pas la gélatine.

Piqûre. — A 18°-20°, développement apparent dès la vingt-quatrième ou trentième heure. Les petites colonies développées le long de la piqûre s'opacifient et deviennent assez rapidement confluentes; à la surface il se forme un enduit blanchâtre, abondant, crémeux, pouvant atteindre les bords du tube. En résumé : culture plus abondante et plus rapide que celle du Bacille d'Eberth; mais la différence est souvent peu marquée et ne peut être utilisée pour baser un diagnostic.

Strie sur gélatine inclinée. — Dès la trentième heure, apparition d'un enduit bleuâtre, peu épais, à contours festonnés, devenant blanchâtre et opaque en vieillissant. Dans les cas types, la culture est plus abondante et plus opaque que celle du Bacille typhique.

Colonies isolées. — En règle, développement de petites colonies lenticulaires à contours découpés, transparentes et bleuâtres d'abord, puis blanches et opaques, plus larges que celles du Bacille typhique; mais, fréquemment, les colonies restent transparentes et gardent l'aspect en montagne de glace caractéristique du Bacille d'Eberth.

Les colonies qui se développent dans la profondeur de la gélatine ont l'apparence de petits grains blanchâtres opaques.

Gélose et sérum solidifié. — Enduit blanchâtre peu caractéristique; parfois des bulles de gaz soulèvent la culture.

Pomme de terre. — En règle, la culture est d'abord jaunâtre puis brune, épaisse, saillante, à surface humide; mais certains Colibacilles donnent une strie mince, non colorée, en glacis, identique à celle du Bacille typhique. La qualité et l'espèce de la pomme de terre ont une grande influence sur l'aspect de la culture.

Sur le milieu de Remy et Sugg le *Bacterium coli* donnerait d'une

façon constante une culture abondante, épaisse, glaireuse ou sèche et toujours colorée en jaune ou en brun.

Lait. — Coagulation en vingt-quatre ou trente heures à 37°.

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — RÉACTIONS BIOCHIMIQUES.

Action sur les sucres. — Dans les cultures aérobies et anaérobies, le Colibacille décompose la lévulose, la lactose, la saccharose, la maltose, la glycose, l'érythrite et la mannite en produisant de l'hydrogène, de l'anhydride carbonique, de l'alcool éthylique et des acides (formique, acétique, butyrique, lactique). Cette propriété, mise en lumière, selon les procédés que nous avons étudiés à propos du Bacille typhique, fournit d'excellents éléments de diagnostic. Il faut savoir que certaines influences, particulièrement la vie en commun avec le Bacille d'Eberth, peuvent faire perdre au Colibacille ses propriétés fermentatives (Remy).

a. *Ensemencement en bouillon lactosé additionné de carbonate de chaux.* — Vers la douzième ou vingtième heure, dégagement de nombreuses bulles de gaz carbonique résultant de l'action des acides produits sur le carbonate de chaux.

b. *Ensemencement sur gélatine lactosée ou mannitée additionnée de tournesol.*— La teinte bleue est virée au rouge puis à la nuance pelure d'oignon.

c. *Ensemencement dans le lait.* — Coagulation rapide.

d. *Ensemencement dans le petit-lait.* — Développement d'une acidité considérable, saturant 7 à 12 p. 100 de solution décinormale de soude.

Un grand nombre d'auteurs ont indiqué des procédés plus ou moins élégants pour mettre en lumière les propriétés fermentatives du Colibacille : on a additionné les milieux lactosés de couleurs dont la teinte est modifiée ou avivée par les acides (fluorescéine, etc.), ou de substances colorées en solutions alcalines et se décolorant par l'apparition de la réaction acide (phénolphtaléine). Nous décrirons, comme exemple, le procédé imaginé par Ramond.

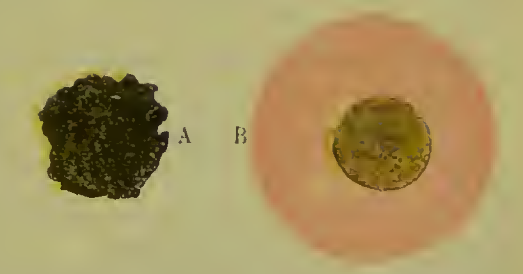


Fig. 209. — Colonies de Bacille typhique (A) et de Colibacille (B) sur gélose de Ramond (d'après Gautié).

Procédé de Ramond. — A un tube de gélose lactosée à 4 p. 100, liquéfiée à douce chaleur, ajouter jusqu'à coloration rouge-cerise une solution aqueuse de *fuchsine acide* (*Rubin S*) puis 2 à 3 gouttes, jusqu'à décoloration, d'une solution aqueuse saturée de carbonate de soude; filtrer et stériliser à 105° pendant cinq minutes; couler le milieu incolore dans une

boîte de Pétri flambée. En poussant sur cette gélose, le Bacille typhique ne produit aucun changement de couleur ; au contraire, l'acide mis en liberté par la culture du Colibacille régénère la teinte rouge et il apparaît autour des colonies de ce bacille une zone rosée caractéristique. Ce procédé est moins sensible que celui à la teinture de tournesol.

Production d'indol. — Le Colibacille produit de l'indol dans les cultures ; c'est là un caractère important et d'une assez grande constance.

La valeur de la réaction de l'indol dans le diagnostic du *Bacterium coli* a été mise en doute par de nombreux auteurs (Rodet et Roux, Malvoz, Dunbar, etc.),qui échouaient souvent à déceler la présence de l'indol dans les cultures de ce bacille. Des recherches plus récentes de Péré, Van Ermengen, Remy et Sugg, etc., montrent que les résultats négatifs tiennent souvent à l'imperfection de la technique employée : « la fonction de l'indol est bien moins sujette à varier qu'on se plaît à le croire ». Cependant Remy a montré que la vie en commun avec le Bacille d'Eberth peut faire perdre définitivement au Colibacille la propriété de former de l'indol. Quoi qu'il en soit, la réaction de l'indol fournit un des meilleurs signes d'identification que nous possédions, à la condition d'opérer avec les précautions suivantes :

1° Faire une culture en eau peptonisée et non en bouillon ordinaire. (D'après Péré, il serait préférable de substituer à la peptone ordinaire la peptone pancréatique.)

2° Examiner cette culture du troisième au dixième jour, jamais plus tard.

3° Effectuer la réaction en suivant exactement la technique indiquée à propos du Bacille typhique.

Cultures en milieux minéraux. — Le *Bacterium coli* produit *d'ordinaire* une culture luxuriante dans les solutions minérales de Nægeli, Maasse, Remy et Sugg (Voy. p. 427).

Développement sur les milieux vaccinés. — Sur des tubes de gélose ou de gélatine où l'on a cultivé du Bacille d'Eberth et qui ont été raclés comme nous l'avons dit plus haut, l'ensemencement de Colibacille donne *d'ordinaire* lieu à un développement moins abondant que sur les tubes neufs, mais manifeste.

Milieux colorés.— Comme le Bacille typhique, le *Bacterium coli* se développe en décolorant le milieu de Nœggerath et la gélose fuchsinée.

Culture en bouillon arsenical. — Le Colibacille type pousse dans un bouillon contenant jusqu'à 1 et 2 grammes d'acide arsénieux par litre (Thoinot et G. Brouardel).

Culture sur artichaut. — Le Colibacille type donne une culture abondante avec coloration verte du milieu (Roger).

§ 2. — VARIABILITÉ DES CILS.

La variabilité des cils est au moins très limitée; le nombre et les caractères des flagella sont peu influencés par les antiseptiques, les

températures dysgénésiques, etc. (Remy et Sugg). L'examen des cils ne doit jamais être négligé quand il s'agit de caractériser un Colibacille.

§ 3. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Tout ce que nous avons dit à propos de la vitalité du Bacille d'Eberth s'applique au Colibacille. Comme nous l'avons signalé à propos de la maladie expérimentale, la virulence du Colibacille est sujette à de grandes variations.

§ 4. — TOXINE.

Malvoz a montré que les cultures en bouillon filtrées sur porcelaine possèdent des propriétés toxiques ; traitées par le sulfate d'ammoniaque, elles donnent un précipité toxique.

Le poison colibacillaire est d'ordinaire peu actif ; il faut injecter de fortes doses de cultures filtrées pour tuer les animaux d'expérience.

Gilbert a décrit l'intoxication aiguë produite par l'injection de la toxine dans une veine auriculaire du lapin ; l'animal présente d'abord de l'affaiblissement musculaire, de l'hypothermie, de la somnolence et du coma ; puis surviennent des secousses convulsives, enfin il se produit une contracture tétanique généralisée qui se prolonge jusqu'à la mort.

Une dose moins forte de toxine produit une intoxication chronique avec diarrhée, somnolence, émaciation et aboutissant souvent à une cachexie mortelle.

Chez le cobaye, l'injection intrapéritonéale de fortes doses provoque une hypothermie se terminant par le collapsus algide et la mort; le sang peut être envahi par les microbes intestinaux et en particulier par le Colibacille (Achard et Renault).

§ 5. — VACCINATION ET SÉROTHÉRAPIE.

Les cobayes et les lapins peuvent être immunisés par des injections répétées de petites doses de cultures vivantes ou de cultures filtrées d'un *Bacterium coli* actif. Albarran et Mosny ont donné au chien et au lapin une immunité très solide en leur injectant à de nombreuses reprises de petites doses de cultures filtrées et de filtrats de macérations d'organes provenant d'animaux morts d'infection colibacillaire. Le sérum des lapins et surtout des chiens ainsi traités est doué de propriétés immunisantes énergiques et même de propriétés thérapeutiques.

Les animaux vaccinés contre le Bacille d'Eberth (Voy. p. 432) ont

en même temps acquis l'immunité contre le Colibacille ; de même la vaccination par injections de cultures filtrées ou entières de Colibacille protège contre le Bacille d'Eberth (Sanarelli, Cesaris-Demel et Orlandi).

Cesaris-Demel et Orlandi ont obtenu un sérum anticolibacillaire immunisant contre l'infection typhique ; il semble, par contre, que le sérum des chevaux vaccinés contre le Bacille typhique soit dépourvu d'action préventive ou curative vis-à-vis du *Bacterium coli*.

§ 6. — AGGLUTINATION.

I. — Le sérum des animaux infectés par le Colibacille, des animaux immunisés, et aussi de l'homme atteint de colibacillose, a des propriétés agglutinantes vis-à-vis du *Bacterium coli*. Mais l'agglutination ne se produit le plus souvent qu'avec le seul bacille qui a causé l'infection : on n'obtient que des résultats négatifs en s'adressant à des Colibacilles légitimes, mais de provenance différente. On ne peut guère compter sur ce procédé de diagnostic.

II. — Le sérum des animaux vaccinés contre le Bacille d'Eberth et celui des typhoïdiques ne possèdent pas la propriété d'agglutiner le *Bacterium coli*, mais, pour que cette réaction ait une valeur, il est important qu'elle soit faite en observant certaines règles.

Tous les sérums humains, en effet, qu'ils proviennent ou non de typhoïdiques, exercent une légère action agglutinante sur le *Bacterium coli* dans les dilutions comprises entre un cinquième et un dixième. On conçoit que cette propriété du sérum humain pourrait induire en erreur un observateur non prévenu, toute erreur est d'ailleurs facile à éviter en opérant de la façon suivante :

Commencer par déterminer exactement le pouvoir agglutinant du sérum typhique qui servira à la réaction, puis faire agir sur la culture du *Bacterium coli* la dose minima de sérum qui suffit pour agglutiner nettement le Bacille d'Eberth ; soit par exemple un sérum agglutinant nettement le Bacille typhique à la dose minima de un centième, c'est cette dilution à 1 p. 100 qui devra être employée pour éprouver le Colibacille. Dans ces conditions on n'observe jamais d'agglutination du Colibacille et on peut utiliser la réaction de Widal comme un excellent élément de diagnostic différentiel, en se souvenant toutefois que certains échantillons de Bacille d'Eberth ne sont pas agglutinés par le sérum typhique.

LE BACILLE DE LA DIARRHÉE VERTE.

Ce bacille ne serait, d'après Lesage et Thiercelin, qu'une variété chromogène du *Bacterium coli*. Il se trouve à l'état de pureté presque complète dans les selles des enfants atteints de diarrhée verte bacillaire.

Inoculations. — Le Bacille de la diarrhée verte est peu pathogène pour les animaux de laboratoire; chez le lapin l'injection intraveineuse ou l'ingestion de cultures amènent la production d'une diarrhée verte; l'animal se rétablit en peu de jours.

Aspect microscopique. — Bâtonnets courts à bouts arrondis absolument analogues au *Bacterium coli* et pouvant présenter les mêmes variations morphologiques que ce bacille.

Cultures. — Le Bacille de la diarrhée verte est facultativement aérobie; il se développe sur les milieux ordinairement employés en produisant une odeur fade, désagréable.

On l'obtient facilement à l'état pur en faisant un isolement sur plaques de gélatine avec une trace des matières fécales d'un enfant atteint de diarrhée verte.

Bouillon. — Trouble uniforme, puis dépôt d'un sédiment verdâtre.

Gélatine. — Pas de liquéfaction.

La piqûre produit une culture grêle, blanchâtre, avec un petit enduit lenticulaire verdâtre à la surface; la strie sur gélatine inclinée produit une culture mince, étendue, verdâtre; au bout de quelques jours la gélatine prend une teinte verte uniforme.

Les colonies isolées se présentent comme de petits disques granuleux verdâtres.

Gélose. — Culture mince, étalée, verdâtre; coloration verte de la gélose.

Pomme de terre. — Enduit abondant envahissant toute la surface de la pomme de terre, présentant un aspect muqueux et coloré en vert sale.

Lait. — Coagulation rapide.

Milieux sucrés. — Fermentation énergique.

BACILLUS TYPHI MURIUM.

Löffler a décrit sous ce nom l'agent d'une épizootie qui tua les souris de son laboratoire. Ce bacille est pathogène pour la souris (*Mus musculus*) et le campagnol (*M. arvicola*). Loser a étudié une épidémie analogue chez le *Mus agrarius*; Merechowsky et Issatchenko ont décrit de pareilles épizooties, le premier chez le spermophile, le second chez le rat blanc Danisz a retrouvé le Bacille de Löffler dans une épidémie des campagnols

Morphologie. — Le Bacille de Löffler-Danisz se rapproche par ses caractères morphologiques du *Bacterium coli*; il se colore par les couleurs basiques d'aniline et ne prend pas le Gram. Il cultive dans les milieux ordinaires; il trouble rapidement le bouillon, fait fermenter le bouillon glucosé, ne liquéfie pas la gélatine et donne sur ce milieu une culture assez analogue à celle du *Bacterium coli*.

Inoculations. — Le Bacille de Danisz tue le *M. musculus* et le *M. arvicola* par inoculation ou par ingestion. Le cobaye, le chien, le chat, les oiseaux sont réfractaires.

Le rat gris est peu sensible et le Bacille de Danisz perd sa virulence après quelques passages par cet animal. Danisz a réussi à triompher de cette

immunité. Il cultive le bacille en ampoules scellées, fait ensuite des passages en série dans des sacs de collodion inclus dans le péritoine du rat, inocule la souris avec le bacille ainsi traité et termine en le faisant passer par des rats de plus en plus âgés. On arrive de cette façon à obtenir un bacille virulent pour le rat gris (*M. decumanus*), le rat noir et le rat blanc (*M. ratus*). A l'aide d'une telle culture déposée sur du pain, il est aisé de produire des épidémies chez les rats d'égout, de maison, etc. L'épidémie s'arrêtant après trois ou quatre passages, par affaiblissement du virus, il est nécessaire de distribuer les cultures à plusieurs reprises, à dix ou quinze jours d'intervalle, de préférence quand les rats sont jeunes et plus sensibles, c'est-à-dire en avril-juin et en septembre-décembre.

On conçoit l'intérêt que présentent ces recherches de Danisz au moment où nos connaissances sur l'étiologie de la peste rendent indispensable la destruction des rats en présence d'une épidémie menaçante.

CHAPITRE XXI

LE BACILLE D'EBERTH ET LE BACTERIUM COLI
LEUR RECHERCHE DANS LES EAUX, LES FÈCES, ETC.
ET LEUR DIAGNOSTIC

L'isolement du Bacille typhique dans les milieux où il se trouve mélangé à de nombreuses espèces microbiennes et particulièrement au *Bacterium coli* présente des difficultés que l'on peut ramener à quatre ordres de faits :

1° Sur la gélatine, à la température ordinaire, les colonies du Bacille typhique se développent lentement (quarante-huit heures environ) ; avant elles, poussent les microbes saprophytes qui liquéfient rapidement la plaque et arrêtent la recherche.

2° Quand on ensemence un mélange de *Bacterium coli* et de Bacille d'Eberth, le plus souvent le développement du Colibacille empêche celui du Bacille d'Eberth et ce dernier microbe passe inaperçu : il y a là une véritable *action empêchante* mise en évidence par Grimbert. Différentes espèces microbiennes jouissent dans les milieux artificiels de la même propriété empêchante vis-à-vis du Bacille d'Eberth (Besson).

3° Remy, qui n'admet pas la réalité de l'*écrasement* du Bacille d'Eberth par le Colibacille, insiste sur la difficulté de déceler le Bacille d'Eberth dans un milieu où ces deux microbes sont mélangés ; il montre que *la vie en commun peut modifier profondément les propriétés des deux bacilles* : le Bacille d'Eberth perdant parfois sa sensibilité vis-à-vis du sérum agglutinant, le *Bacterium coli* ses propriétés fermentatives et indolformative.

4° La méthode des plaques de gélatine ordinaire ne permet d'ensemencer qu'une très petite quantité de l'eau suspecte : on conçoit dès lors que si le bacille se trouve dans l'eau en faible proportion, il puisse passer inaperçu.

Aussi les bactériologistes se sont-ils ingéniés à imaginer des procédés permettant de déceler sûrement la présence du Bacille

typhique dans les eaux. Tous ces procédés s'appliquent également à la recherche du *Bacterium coli*. Nous passerons en revue les principaux.

Article I. — RECHERCHE DU BACILLE D'EBERTH ET DU BACTERIUM COLI.

§ 1er. — PROCÉDÉS ANCIENS.

Nous plaçons sous cette rubrique un certain nombre de procédés, utilisés jusqu'à ces dernières années, mais ne fournissant que des résultats aléatoires, impuissants à déceler le Bacille d'Eberth quand il se trouve mélangé au Colibacille et à peu près abandonnés aujourd'hui.

a. Procédé de Rodet. — Rodet a montré que le *Bacterium coli* et le Bacille typhique se développent rapidement à 45° alors que la plupart des autres bactéries ne cultivent plus à cette température, et il a basé sur ce fait un procédé de recherche de ces microbes; une certaine quantité (20 à 100 centimètres cubes) de l'eau suspecte est versée dans un matras contenant du bouillon de bœuf ordinaire stérilisé; puis le matras est placé à l'étuve à 45°. Si le bouillon est trouble au bout de vingt à vingt-quatre heures, il y a de fortes présomptions pour que ce trouble relève de la présence du *Bacterium coli* ou du Bacille d'Eberth. Un examen de la culture et au besoin un isolement sur plaques de gélatine permettent de lever tous les doutes.

Ce procédé permet de découvrir le Bacille d'Eberth quand il n'est pas associé au *Bacterium coli*; mais dans les cas les plus fréquents, où le Bacille d'Eberth existe à l'état de mélange au *Bacterium coli*, l'isolement du premier de ces microbes est impossible.

b. Procédé de Chantemesse et Widal. — Chantemesse et Widal montrent que le *Bacterium coli* et le Bacille d'Eberth se développent dans les milieux de culture additionnés de 1 p. 400 d'acide phénique, et appliquent ce principe à la recherche des deux microbes dans l'eau.

A des tubes contenant 20 centimètres cubes de gélatine ordinaire liquéfiée à une douce chaleur on ajoute 1 centimètre cube de solution phéniquée à 5 p. 100 et quelques gouttes de l'eau à analyser; puis on coule le contenu des tubes dans des boîtes de Petri. Sur les plaques obtenues par ce procédé il se développe malheureusement un certain nombre de bactéries liquéfiantes qui entravent rapidement la recherche. Il est d'ailleurs nécessaire d'ensemencer pour chaque analyse un grand nombre de plaques, étant donnée la petite quantité d'eau utilisée pour chaque ensemencement; enfin ce procédé échoue à permettre l'isolement du Bacille d'Eberth quand il est mélangé au *Bacterium coli*.

c. Procédé de Vincent. — Vincent, en combinant les résultats des observations de Rodet d'une part, de Chantemesse et Widal d'autre part, a composé un procédé mixte, qui a longtemps été le procédé de choix.

Vincent pratique les ensemencements dans du bouillon phéniqué à 1 p. 1 000 et fait la culture à 41°,5 ou 42°.

En pratique, on prépare six tubes contenant 10 centimètres cubes de bouillon ordinaire; au moment du besoin on ajoute à chacun d'eux 5 à 6 gouttes d'une solution phéniquée à 5 p. 100 et 1/2 à 1 centimètre cube de

l'eau suspecte; chaque tube est muni d'un capuchon de caoutchouc au-dessus du tampon d'ouate, pour éviter l'évaporation de l'acide phénique. Les tubes sont placés à l'étuve à 41°,5 ou 42°. S'il se produit un trouble vers la douzième-vingtième heure on réensemence le contenu des tubes troublés dans de nouveaux tubes de bouillon phéniqué que l'on place également à 41°,5. Ce second passage donne en général une culture pure de *Bacterium coli* quand l'eau contenait ce bacille; cependant il faut savoir que quelques saprophytes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus luteus*, Streptocoque blanc de l'eau, *Proteus vulgaris*, etc.) se développent dans ces conditions. On ne peut songer à se débarrasser de ces microbes par des passages successifs en milieux phéniqués : une fois accoutumés aux milieux phéniqués, ils s'y développent aussi bien que le Colibacille.

La présence d'un trouble à ondes soyeuses dans les tubes constitue un bon signe du Colibacille ou du Bacille typhique, mais il faudra toujours compléter la recherche par l'examen microscopique et au besoin par un isolement sur gélatine. Le microbe isolé sera soumis à toutes les épreuves que nous énumérerons plus loin.

Il faut savoir que dans le bouillon phéniqué le *Bacterium coli* et le Bacille d'Eberth se présentent souvent sous la forme de cocco-bacilles accouplés par deux et immobiles.

Le procédé de Vincent ne permet pas l'isolement du Bacille typhique quand il se trouve mélangé au *Bacterium coli*.

d. Procédé de Péré. — Le procédé de Péré n'est qu'une modification du précédent, modification dont le but est de permettre l'ensemencement de grandes quantités de l'eau à examiner.

On prépare un bouillon très fortement nutritif (viande 1 000, eau 1 000, peptone 50). Ce bouillon est réparti dans des fioles de Vivien à raison de 50 centimètres cubes par fiole. On stérilise à l'autoclave, puis, au contenu de chaque fiole on ajoute 3 centimètres cubes de solution phéniquée à 5 p. 100 et une quantité d'eau à analyser suffisante pour faire 150 centimètres cubes. On prépare ainsi 5 à 6 fioles qu'on place à l'étuve à 41°. — Dès qu'un trouble se produit (quinzième-vingtième heure) on ensemence, avec le contenu des fioles troublées, des tubes de bouillon phéniqué à 1 p. 1 000 et l'on place ces tubes à l'étuve à 41°. On termine la recherche comme dans le procédé de Vincent.

e. Procédé de Pouchet et Bonjean. — Variante du procédé de Vincent. Dans des ballons contenant 100 centimètres cubes de bouillon stérilisé, on verse 150 centimètres cubes de l'eau à analyser et 5 centimètres cubes de solution phéniquée à 5 p. 100. On porte à l'étuve à 42°; si un trouble se produit, on fait trois passages en bouillon phéniqué à 1 p. 1 000 à l'étuve à 42°, puis on ensemence en bouillon ordinaire. La culture en bouillon ordinaire, après huit jours de séjour à l'étuve à 36°, est inoculée à un cobaye ($0^{cc},3$ p. 100 grammes d'animal); si l'animal succombe, on fait des cultures avec le sang du cœur, la pulpe des viscères, etc.

§ 2. — PROCÉDÉS RÉCENTS.

PROCÉDÉ D'ELSNER.

Cette méthode permet de déceler le Bacille typhique dans les milieux (eaux, fèces, etc.) où il est associé au *Bacterium coli*; elle est basée sur ce fait que le Bacille typhique et le *Bacterium coli* se déve-

loppent à l'exclusion de la plupart des autres microbes sur une gelée de pommes de terre additionnée d'iodure de potassium.

On opérera de la façon suivante :

1° On prépare une série de tubes à essai contenant 10 centimètres cubes de macération de pomme de terre gélatinisée (Voy. p. 41) et on les stérilise à l'autoclave. D'un autre côté on stérilise la solution suivante :

Eau distillée	50 grammes.
Iodure de potassium	10 —

2° Au moment du besoin on ajoute à chaque tube de gelée de pomme de terre liquéfiée à douce chaleur 1 centimètre cube (20 gouttes) de la solution iodurée. On obtient ainsi une gélatine iodurée à 1 p. 100.

3° Chacun des tubes ainsi préparés est ensemencé avec quelques gouttes de l'eau suspecte ; puis le contenu du tube est coulé dans une boîte de Pétri et abandonné à la solidification ; on doit préparer un grand nombre de boîtes, au moins six à huit, étant donnée la petite quantité d'eau qui sert à faire chaque ensemencement.

4° D'après Elsner, sur ces plaques le *Bacterium coli* donne à 20°, dès le deuxième jour, des colonies arrondies opaques et légèrement brunâtres ; les colonies du Bacille d'Eberth au contraire apparaissent seulement vers le quatrième jour et sont plus petites, transparentes, à peine visibles ; les autres bactéries ne se développent pas.

En réalité, diverses bactéries, et même des liquéfiantes, se développent sur les plaques, et les caractères des colonies du Bacille d'Eberth et du *Bacterium coli* ne sont pas aussi différenciés que l'a dit Elsner ; il faut bien savoir que le milieu d'Elsner ne possède aucune propriété spécifique qui lui permettrait d'assurer le développement du *Bacterium coli* et du Bacille d'Eberth à l'exclusion des autres microbes ; son seul avantage est de permettre le développement du Bacille d'Eberth à côté de celui du *Bacterium coli*.

On devra par conséquent étudier avec soin toutes les colonies non liquéfiantes et non chromogènes qui se développent sur les plaques ; ces colonies seront prélevées avec une öse de platine forte et reportées dans des tubes de bouillon à 37°. Au bout de vingt à vingt-quatre heures, l'examen des cultures en bouillon renseignera sur la morphologie des microbes isolés ; on ne retiendra, pour les soumettre aux épreuves que nous énumérerons plus loin, que les cultures produites par de courts bacilles à bouts arrondis.

Si une de ces cultures suspectes présentait une impureté, on pratiquerait un nouvel isolement sur gelée d'Elsner : une öse de la culture serait portée dans un premier tube, dont une goutte servirait à ensemencer un tube n° 2 dont 3 gouttes serviraient à ensemencer un tube n° 3 (Voy. la méthode générale, p. 84).

La recherche du *Bacterium coli* et du Bacille typhique dans les matières fécales serait pratiquée d'une manière analogue : un tube de gélatine iodurée est ensemencé avec une trace de matières fécales ; après agitation une goutte du contenu de ce tube sert à ensemencer un tube n° 2, dans lequel on prélève enfin 2 ou 3 gouttes pour ensemencer un tube n° 3. Sur les plaques préparées avec le contenu de chacun de ces tubes on étudie les diverses espèces de colonies non liquéfiantes comme il a été dit plus haut.

Remarque. — La méthode d'Elsner, telle qu'elle vient d'être exposée, donne lieu à de fréquents mécomptes, tantôt les plaques sont liquéfiées rapidement et la recherche est interrompue, tantôt on échoue à retrouver du Bacille d'Eberth que l'on a introduit, à titre de contrôle, dans une eau, un mélange de cultures, etc. Aussi de nombreux expérimentateurs ont-ils cherché à modifier et à améliorer le procédé.

PROCÉDÉ DE GRIMBERT.

Grimbert attribue les insuccès de la méthode d'Elsner à l'inconstance du milieu employé (variation de composition chimique de la pomme de terre) et à l'indétermination de son degré d'acidité. L'addition d'iodure de potassium n'est d'ailleurs pas indispensable. A la condition de maintenir une acidité telle que 10 centimètres cubes du milieu soient neutralisés par 4 à 5 centimètres cubes d'eau de chaux, on peut utiliser simplement la gélatine ordinaire au bouillon de viande. Grimbert préfère employer un milieu de composition chimique constante, préparé ainsi qu'il suit :

Dissoudre dans 1000 centimètres cubes d'eau :

Maltose	1 gramme.	Sulfate de potasse	2 grammes.
Amidon soluble	2 grammes.	Sulfate de magnésie	2 —
Asparagine	2 —	Bimalate d'ammoniaque	2 —
Phosphate neutre de potasse	2 —	Carbonate de magnésie	1 gramme.

Dans le mélange dissoudre 15 p. 100 de gélatine. Clarifier au blanc d'œuf, chauffer à 115°, filtrer. Essayer la réaction.

Pour vérifier la réaction de la gélatine, en prendre 10 centimètres cubes, les verser dans 50 centimètres cubes d'eau distillée chaude, ajouter quelques gouttes de solution alcoolique de phénolphtaléine, puis, avec la burette de Mohr, faire tomber dans le mélange de l'eau de chaux jusqu'à teinte rose persistante. Si la neutralisation exige plus de 5 centimètres cubes d'eau de chaux, on ajoute à la gélatine de petites quantités de solution normale de soude jusqu'à ce que la neutralisation de 10 centimètres cubes soit obtenue avec 5 centimètres cubes d'eau de chaux. Ce degré d'acidité correspond à un millième d'acide sulfurique.

Au moment du besoin le milieu peut être additionné de 1 p. 100 d'iodure ou de bromure de potassium.

Le milieu de Grimbert s'emploie comme celui d'Elsner; l'apparition des colonies y est plus lente, les premières ne se montrent pas avant le troisième jour. Ce procédé n'a guère d'avantages sur le procédé primitif d'Elsner.

PROCÉDÉ DE REMY.

Remy propose l'emploi d'un milieu plus nutritif et moins acide que celui de Grimbert; sa *gélatine différentielle* lui a permis d'isoler le Bacille typhique dans toutes les selles typhoïdiques qu'il a étudiées (vingt-trois cas).

Préparation de la gélatine différentielle. — Introduire dans un matras les produits suivants:

Asparagine..............	6 grammes.	Phosphate bisodique......	5 grammes.
Acide oxalique...........	0gr,5	Sulfate de potasse........	1gr,25
Acide lactique...........	0gr,15	Chlorure de sodium.......	2 grammes.
Acide citrique...........	0gr,15	Peptone Witte............	30 —

Ajouter un litre d'eau distillée; chauffer pendant quinze minutes à 110°. Au sortir de l'autoclave verser le liquide bouillant dans un nouveau matras contenant 120 à 150 grammes de gélatine extra, agiter pour dissoudre, puis ajouter de la solution de soude jusqu'à alcalinisation légère. Porter à l'autoclave à 110° pendant quinze minutes, puis acidifier le mélange avec une solution demi-normale d'acide sulfurique (1) de façon que 10 centimètres cubes de gélatine aient une acidité telle qu'elle soit saturée par l'addition de 0cc,2 de solution demi-normale de soude (2). Agiter, chauffer dans la vapeur à 100° pendant dix minutes et filtrer.

Après filtration vérifier l'acidité. Pour cela, prélever 10 centimètres cubes de gélatine, les mélanger à 100 centimètres cubes d'eau distillée et ajouter quelques gouttes de solution de phénolphtaléine. Dans le mélange laisser tomber, à l'aide d'une pipette de 1 centimètre cube graduée en dixièmes, de la solution demi-normale de soude; la coloration rouge doit apparaître dès que 0cc,2 de cette solution ont été ajoutés.

L'acidité voulue étant obtenue, faire dissoudre 2gr,50 de sulfate de magnésie par litre de gélatine, répartir en tubes de 10 centimètres cubes et stériliser par trois chauffages à 100°.

Au moment de l'emploi, introduire dans chaque tube 1 centimètre cube d'une solution stérilisée de lactose à 35 p. 100 et 0cc,1 d'une solution phéniquée à 2,5 p. 100.

Le milieu de Remy s'emploie de la même façon que la gélatine d'Elsner; pas plus que cette dernière il n'est électif, les divers microbes y poussent, toutefois les espèces liquéfiantes s'y développent mal et il permet au Bacille d'Eberth de cultiver à côté du *Bacterium coli*. La culture de ces bacilles se manifeste dès le deuxième jour.

(1) La solution normale contient 98 grammes de H^2SO^4 par litre.

(2) Cette acidité équivaut à 0gr,5 de H^2SO^4 par litre.

Caractères des cultures. — *Colibacille.* — Les colonies apparaissent après deux jours. Les colonies profondes sont arrondies, ovoïdes ou fusiformes et colorées en brun jaunâtre ; elles sont parfois accompagnées par de fines bulles de gaz.

Les colonies superficielles, parfois transparentes et bleutées au début, deviennent rapidement opaques ; certaines restent globuleuses, brun jaunâtre, d'autres sont étalées, à contours irréguliers.

Bacille d'Eberth. — Les colonies se montrent aussi après deux jours ; les colonies profondes sont blanc bleuté, plus petites que les colonies coliennes, et ne donnent jamais de bulles de gaz. Les colonies superficielles ne sont bien visibles que le troisième jour ; au début elles « rappellent assez bien l'aspect des moisissures » puis elles s'étalent, deviennent plus bleutées et peuvent atteindre les dimensions d'une pièce de cinquante centimes. Dans certains cas les différences entre les colonies éberthiennes et coliennes sont minimes.

PROCÉDÉ DE L'AUTEUR.

Dès 1896 nous avons fait subir au procédé d'Elsner des modifications rendant son emploi plus aisé et plus efficace dans les analyses d'eau. Les procédés à la gélatine ne permettent l'ensemencement que de petites quantités d'eau, même si on multiplie le nombre des plaques, ce qui complique beaucoup les recherches ; de plus, les plaques d'Elsner sont souvent liquéfiées dès le second jour par des saprophytes, et la recherche se trouve interrompue. Une pratique de plusieurs années nous fait préférer le procédé suivant, qui a l'avantage d'éliminer rapidement les saprophytes et de permettre l'ensemencement de quantités notables d'eau.

1° Dissoudre à chaud dans 1 000 grammes d'eau 20 grammes de peptone Chapoteaut, 5 grammes de sel marin et 2 grammes de phosphate de soude. Ne pas alcaliniser ; porter à 115°, filtrer, répartir en tubes à raison de 10 centimètres cubes par tube ; stériliser à 115°. Au besoin, on peut remplacer cette solution par le bouillon peptonisé ordinaire.

2° Au moment de l'emploi, prendre une dizaine de tubes d'eau de peptone ; à chaque tube ajouter 15 à 30 gouttes de solution de Gram (Voy. p. 145), récemment préparée, puis 10 centimètres cubes de l'eau suspecte.

La quantité de liqueur de Gram à ajouter varie un peu avec la composition du bouillon ; les premières gouttes ajoutées se décolorent rapidement, puis vient un moment (15e à 25e goutte) où le milieu garde une légère teinte brun rose qui disparaît en cinq à six minutes : c'est le moment où il faut arrêter l'addition de liqueur de Gram.

3° Porter les tubes à l'étuve à 37°-38°. Dans ces conditions le Colibacille pousse dès la huitième-douzième heure, le Bacille d'Eberth,

un peu plus tard, vers la quinzième-vingtième heure, mais avant les autres microbes. Examiner fréquemment les tubes.

4° Arrêter la culture vers la dix-huitième ou vingtième heure, faire avec le contenu des tubes qui ont troublé, un nouveau passage en bouillon-Gram.

5° Opérer de même un troisième passage avec les tubes précédents. Vers la quinzième ou vingtième heure retirer de l'étuve les tubes de troisième passage, faire avec leur contenu des isolements sur gélatine d'Elsner. Nous pratiquons d'ordinaire en même temps des ensemencements en bouillon ordinaire qui servent à pratiquer des inoculations.

6° Examiner les plaques d'Elsner, différencier les colonies qui y poussent comme nous l'avons dit plus haut.

Ce procédé nous a permis d'isoler dans des eaux le Colibacille, le Bacille typhique et le Bacille de Friedländer.

Article II. — DIAGNOSTIC DU BACTERIUM COLI ET DU BACILLE TYPHIQUE.

I. — Un bacille est suspect d'appartenir au groupe des Bacilles d'Eberth ou d'Escherich quand il présente les caractères suivants :

1° Bacille à bouts arrondis, mobile ou non, décolorable par le Gram, ne formant jamais de capsule.

2° Trouble avec ondes soyeuses des cultures en bouillon.

3° Pas de liquéfaction de la gélatine (Voy. aux chapitres précédents les caractères des cultures).

II. — Ce point une fois établi, il reste à déterminer si la culture (pure, bien entendu, provenant de l'ensemencement d'une colonie isolée sur gélatine) relève du Bacille d'Eberth ou du *Bacterium coli*.

C'est ici que surgissent les difficultés ; si l'on se rapporte à ce que nous avons dit dans les chapitres précédents, on constate qu'il est impossible de confondre un Colibacille type avec un Bacille d'Eberth caractéristique. Les caractères des cils, la réaction de l'indol, l'étude des propriétés fermentatives, la recherche de l'agglutination fournissent un diagnostic inébranlable.

Malheureusement, certains échantillons de Colibacille perdent facilement (par la vie en commun avec le Bacille d'Eberth, par exemple) leurs propriétés fermentatives et indolformative, d'autres sont très mobiles, certains donnent une culture très grêle sur pomme de terre et des colonies éberthiformes sur gélatine. De même, certains Bacilles typhiques sont peu mobiles, leurs cils sont difficilement colorables, d'autres donnent sur pomme de terre une

culture un peu colorée, ressemblant aux cultures coliennes, enfin, sous l'influence de la vie en commun avec le Colibacille, quelques échantillons perdent leur propriété caractéristique d'être agglutinés par le sérum typhique. De là une grande confusion, la création de groupes de *paracolibacilles* et de *bacilles eberthiformes*, et le triomphe des unicistes, qui dans l'échec des moyens de diagnostic voient la confirmation de leur hypothèse.

En matière aussi délicate, il faut s'en tenir aux faits démontrés : il existe des organismes que dans l'état actuel de nos connaissances on ne peut légitimement classer ni parmi les Colibacilles, ni parmi les Bacilles d'Eberth, constatons leur existence, notons leurs caractères et efforçons-nous d'améliorer nos moyens d'investigation.

Quoi qu'il en soit, le diagnostic aura pour base les épreuves suivantes (Voy. le tableau de la page 462) :

Pour poser le diagnostic, il faut réunir un faisceau de caractères convergents ; la recherche des propriétés fermentatives, de la fonction de l'indol, des caractères des cils et de l'agglutination permettront dans la plupart des cas d'affirmer la nature eberthienne ou colienne du microbe. Quand un bacille, présentant d'autre part tous les attributs du Bacille d'Eberth, n'est pas agglutiné par le sérum typhique, on le soumet à l'épreuve que nous indiquons en 10 ; il pourra être considéré comme Bacille d'Eberth si le cobaye, auquel on a injecté tous les deux jours 2 centimètres cubes de sa culture en bouillon âgée de quarante-huit heures, fournit après quinze jours un sérum agglutinant le Bacille typhique authentique au titre minimum de 1/40 (Remy).

Mais il peut exister des Bacilles d'Eberth non agglutinables par le sérum typhique, incapables de conférer au sang du cobaye la propriété d'agglutiner le Bacille typhique, et dont la diagnose est par conséquent impossible par les moyens dont on dispose aujourd'hui.

PROCÉDÉS DE DIAGNOSTIC.	BACTERIUM COLI.	BACILLE D'EBERTH
1° Ensemencement en bouillon lactosé carbonaté, à + 37°.	Dégagement de bulles de gaz abondantes (12e-36e heure). (?)	Pas de dégagement de gaz.
2° Ensemencement en strie sur la gélatine lactosée additionnée de tournesol.	Virage de la teinte bleue au rouge, puis à la teinte pelure d'oignon, le long de la strie (?).	Pas de virage.
3° Culture en lait.	Coagulation en 24-36 heures. (?)	Pas de coagulation.
4° Culture sur pomme de terre et sur le milieu de Remy et Sugg.	Culture épaisse brunâtre (??).	Culture mince, incolore en glacis (??).
5° Culture sur artichaut.	Culture abondante et coloration verte du milieu (?).	Aucune culture apparente (?) Pas de changement de coloration.
6° Culture en solution minérale de Nœggeli, Remy et Sugg, etc.	Culture abondante et rapide. (??)	Culture tardive et grêle. (??)
7° Culture en eau peptonisée.	Produit de l'indol (?).	Ne produit pas d'indol.
8° Examen des cils.	Cils peu nombreux (3 à 4 par bacille) et courts.	Cils nombreux (8-18), longs, flexueux, onduleux (?).
9° Action du sérum typhique (dose agglutinante minima).	Pas d'agglutination.	Agglutination nette. *Exceptions possibles.*
10° Inoculations répétées au cobaye. Examen du sérum.	Sérum n'agglutinant pas le Bacille typhique légitime à 1/40.	Sérum agglutinant le Bacille typhique légitime à 1/40. *Quelques exceptions possibles.*
11° Inoculation au cobaye.	Résultats très variables suivant la virulence du microbe.	Résultats très variables suivant la virulence du microbe.
12° Inoculation simultanée du sérum antityphique.	Si le bacille est virulent, l'inoculation simultanée de sérum antityphique ne préserve pas l'animal (??).	Quand le bacille est virulent, l'inoculation simultanée de sérum antityphique préserve l'animal.

CHAPITRE XXII

LE COCCUS DE LA FIÈVRE MÉDITERRANÉENNE

Bruce a décrit sous le nom de *fièvre méditerranéenne* (ou fièvre de Malte) une maladie qui sévit à Malte et qui était confondue jusqu'à lui soit avec la fièvre typhoïde, soit avec la fièvre palustre.

Bruce a montré que l'agent spécifique de la fièvre méditerranéenne est un coccus qu'il a décrit sous le nom de *Micrococcus melitensis*; ses recherches ont été confirmées par celles de Gipps et de Hughes.

A Malte la fièvre méditerranéenne est endémique et atteint chaque année environ 3 p. 100 de l'effectif de la garnison anglaise; parfois elle devient épidémique et peut alors causer une morbidité de 15 et de 20 p. 100.

A l'autopsie des individus ayant succombé à la fièvre méditerranéenne, le *Micrococcus melitensis* se trouve en culture pure dans la rate, le foie, les reins. Il ne passe jamais dans le sang. Pendant la vie, on peut l'obtenir aisément par ponction de la rate des individus atteints.

Article I. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

Le lapin, le cobaye, la souris sont réfractaires au *Micrococcus melitensis*, seul le *singe* s'est montré réceptif.

A la suite de l'inoculation sous-cutanée d'une petite quantité de culture sur gélose délayée dans un peu d'eau stérile, le singe fait une maladie analogue à celle de l'homme. La température centrale s'élève de 2 à 3 degrés tout en présentant fréquemment des rémissions quotidiennes qui donnent à la courbe une certaine ressemblance avec celle de la fièvre rémittente palustre; souvent une période d'apyrexie interrompt pour quelques jours le cours de la fièvre, puis la température s'élève de nouveau.

La maladie peut se prolonger pendant des mois et aboutir à la guérison, mais, souvent, la mort survient vers la fin du deuxième septénaire (quatre fois sur sept inoculations).

A l'autopsie, le foie et la rate sont tuméfiés; il n'existe jamais d'ulcérations des plaques de Peyer. Le foie, la rate et les reins contiennent en culture pure le Coccus de Bruce.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le *Micrococcus melitensis* est rond ou légèrement ovale; il mesure environ 0,3 μ de diamètre. Il est immobile. Le plus souvent on l'observe à l'état isolé, quelquefois il est groupé en diplocoques et rarement en très courtes chaînettes.

Coloration. — Le coccus se colore aisément par les solutions de couleurs basiques d'aniline; il ne prend pas le Gram.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Coccus de Bruce est aérobie; il se développe de préférence en bouillon et sur gélose ordinaire. A + 22° le développement est insignifiant; à 25° la culture est possible, mais la température optima est de 37° environ. Le développement, toujours tardif, ne commence que plusieurs jours après l'ensemencement.

Bouillon. — Au bout de trois à quatre jours à 37° le bouillon présente un trouble uniforme; il ne se forme pas de pellicule à la surface.

Gélose. — *Piqûre.* — Au bout de quelques jours à 37° apparaissent autour du point piqué de petites taches d'un blanc de perle et, sur le trait de piqûre, de petites colonies sphériques. A la longue les colonies de la surface se réunissent pour former une rosette, le long de la piqûre les colonies confluent en une traînée jaune brun à contour dentelé.

Strie. — Le long de la strie, à 37°, apparaissent vers la quatre-vingtième heure de très petites colonies atteignant de 2 à 3 millimètres de diamètre; après neuf ou dix jours, les colonies sont circulaires, font légèrement saillie, leur aspect est lisse et brillant, par transparence leur centre paraît jaune, leur périphérie blanc bleuâtre ; à la lumière réfléchie elles sont d'un blanc laiteux.

Gélatine. — En piqûre à 22° le développement est nul ou insignifiant; à la surface il se forme parfois une petite colonie blanche de la grosseur d'une tête d'épingle. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Pomme de terre. — Le *Micrococcus melitensis* ne se développe pas sur la pomme de terre.

CHAPITRE XXIII

LE BACILLE DE L'INFLUENZA

Le Bacille de l'influenza a été découvert par Pfeiffer ; les travaux de Pfeiffer ont été confirmés par ceux de Weichselbaum, Huber, Borchardt, Klein, Baumler, etc.

L'influenza est une maladie exclusivement humaine ; le bacille spécifique existe dans les crachats, le mucus nasal, les voies respiratoires. Dans le poumon il peut déterminer la production de foyers de broncho-pneumonie présentant des caractères histologiques spéciaux. Le bacille persiste dans les crachats pendant des semaines après la guérison et plus longtemps encore au niveau des lésions chroniques (tuberculeuses, etc.) du poumon. Les symptômes de la maladie relèvent d'une intoxication plus que d'une infection généralisée. Pfeiffer n'a jamais pu déceler le bacille dans le sang des malades ; Meunier l'a trouvé, pendant la vie, quatre fois sur huit, dans le sang des grippés ; Rosenthal enfin dit que dans tous les cas à Bacille de Pfeiffer terminés par la mort il a, à l'autopsie, trouvé le microbe dans le sang du cœur, en grande abondance (1).

Les expérimentateurs ont parfois échoué à déceler le Bacille de Pfeiffer dans l'influenza. Pfeiffer ne l'a pas trouvé dans la grippe de 1899 ; nous-même dans une épidémie très bruyante de grippe, à Rennes, en 1897-1898, ne l'avons décelé que dans 80 p. 100 des cas observés ; Achalme, Rosenthal, etc., ont fait des constatations analogues. De là à nier la spécificité du Bacille de Pfeiffer, il nous semble qu'il y a quelque témérité. C'est pourtant à cette conclusion qu'arrive Rosenthal, écrivant que « le coccobacille hémophile (ou de Pfeiffer) est un microbe ordinaire de la flore pathologique du poumon, il n'est pas le bacille de la grippe ». Ce que nous avons dit de la persistance du Bacille de Pfeiffer dans les lésions pulmonaires chroniques explique, sans qu'il soit besoin de nier sa spécificité, qu'on puisse le rencontrer dans la flore des cavernes, des bronchites tuberculeuses, etc. ; d'ailleurs nous ne répugnons pas à admettre qu'il soit susceptible, en

(1) Le microbe que Canon et Bruschettini ont rencontré dans le sang des grippés diffère absolument du Bacille de Pfeiffer ; il est probable que Canon et Bruschettini se sont trouvés en présence d'une bactérie existant sur la peau et qui a souillé le sang au moment du prélèvement ; ce microbe est un petit streptocoque poussant très bien sur les milieux ordinaires de culture et pathogène pour le lapin.

certaines circonstances, de vivre d'une vie saprophytique dans l'organisme humain : c'est ce que l'on observe chaque jour pour le Pneumocoque, le Bacille de Löffler, peut-être le Bacille d'Eberth, dont on ne songe pas cependant à mettre en doute la spécificité.

Dans l'influenza, et spécialement au niveau des lésions pulmonaires, le Bacille de Pfeiffer est fréquemment associé à d'autres germes pathogènes, particulièrement au Pneumocoque et au Streptocoque. Ce sont en général ces associations, sur lesquelles nous aurons à revenir, qui jugent de la gravité de la maladie.

Article I. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

De ses recherches Pfeiffer a tiré cette conclusion que les espèces animales, sauf le *singe*, sont réfractaires au Bacille de l'influenza. Il y a peu à ajouter à ces données.

Chez le singe, l'inoculation d'une culture pure ou de crachats de grippés, dans la trachée, le poumon ou les fosses nasales, détermine une maladie analogue à l'influenza humaine et se terminant d'ordinaire par la guérison ; une fois la mort est survenue avec des lésions pulmonaires analogues à celles de l'homme ; le bacille se trouvait en petite quantité dans les sécrétions bronchiques, le mucus pulmonaire et le sang.

Le rat, le cobaye, le porc, le chat, le chien, le pigeon, sont entièrement réfractaires.

La souris succombe à l'injection intrapéritonéale de culture pure; il en est de même du lapin qui succombe parfois à l'inoculation de fortes doses de cultures pures (deux à trois cultures sur tube de gélose-sang, délayées dans du bouillon et injectées dans la veine auriculaire) ; mais chez ces animaux le bacille ne pullule pas et l'animal meurt de l'intoxication causée par les produits solubles injectés en même temps que le bacille : le fait que les cultures tuées par le chloroforme amènent également la mort confirme cette manière de voir. Pfeiffer n'a jamais obtenu chez les animaux autres que le singe « une multiplication des bacilles inoculés, une véritable infection (1) ».

Cependant Meunier ayant inoculé sept lapins avec des cultures, a obtenu deux fois la mort avec pullulation du bacille dans le sang (Exp. I) et dans les lésions broncho-pulmonaires et rénales (Exp. III). Cantani est arrivé à tuer le lapin avec de petites doses de cultures injectées dans la substance cérébrale.

(1) Le microbe de Canon et de Bruschettini est pathogène pour le lapin et augmente de virulence par les passages en série chez cet animal, mais,comme nous l'avons dit, il n'a rien de commun avec le Bacille de Pfeiffer.

Rosenthal, inoculant dans le poumon du lapin un mélange de cultures de Bacille de Pfeiffer et de Staphylocoque doré non virulent, a vu l'animal mourir « de congestion pulmonaire, en général avec septicémie ». Mais l'auteur ne nous apprend rien sur la nature de cette septicémie et sur la recherche des microbes chez ses animaux ; ses expériences méritent d'être développées et confirmées.

RECHERCHE DU BACILLE DE L'INFLUENZA.

Le Bacille de la grippe existe dans les crachats et le mucus nasal ; la recherche portera de préférence sur les crachats ; Pfeiffer insiste sur leurs caractères macroscopiques ; ils sont d'une couleur jaune verdâtre, épais et purulents, ordinairement concrétés en petites masses compactes. Le bacille siège entre les cellules de pus et à l'intérieur de celles-ci. La recherche sera faite par l'examen microscopique et par les cultures (Voy. plus loin).

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Bacille de Pfeiffer se présente sous l'aspect d'un très petit bâtonnet et même d'un coccobacille : c'est une des plus petites espèces microbiennes connues. Il est isolé ou réuni en chaînettes de deux ou quatre éléments ; dans les crachats on le trouve en véritables amas ; il siège quelquefois à l'intérieur des leucocytes, mais jamais dans leurs noyaux. Dans les cultures il est un peu plus volumineux que dans les crachats ; quelquefois même il y prend la forme de minces bâtonnets à bouts arrondis. Klein insiste sur la fréquence dans les cultures de longs filaments streptobacillaires et de bacilles à vacuole centrale ; il a observé également des *formes d'involution* : formes allongées, sinueuses, simulant parfois l'enchevêtrement, filaments recourbés, bacilles renflés, ovalaires ou en massue.

Le Bacille de l'influenza est immobile.

Coloration. — Le Bacille de Pfeiffer se colore assez difficilement par les couleurs basiques et ne prend pas le Gram. Le procédé de choix pour le colorer consiste à employer la fuchsine de Ziehl diluée et il est nécessaire de laisser agir le colorant pendant une dizaine de minutes. On peut utiliser de la même manière le bleu de méthylène phéniqué ou le violet de Nastikow ; la coloration s'opère plus vite à chaud.

a. *Crachats. Cultures.* — Prélever une petite parcelle au sein d'un crachat et en préparer des lamelles qui seront colorées pendant dix minutes avec le Ziehl dilué. Opérer de même pour les lamelles préparées avec les cultures.

b. *Coupes.* — Les coupes passant par les foyers de broncho-pneumonie grippale contiennent de nombreux bacilles ; Pfeiffer conseille de les traiter de la façon suivante :

Fixer à l'alcool, monter à la celloïdine (nous préférons la paraffine) ;



Fig. 210. — Bacille de la grippe. — Crachats. — Fuchsine de Ziehl diluée (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. IV).

Fig. 211. — Bacille de la grippe. — Culture sur gélose-sang. — Fuchsine de Ziehl diluée (Reich. ; Obj. 1/12 imm.; Oc. IV).

colorer les coupes pendant une demi-heure dans la fuchsine de Ziehl diluée ; au sortir du bain colorant, les traiter pendant quelques secondes par de l'alcool absolu très faiblement acidulé avec de l'acide acétique. Dès que la coloration rouge foncé des coupes a fait place à une teinte rose violet uniforme, porter celles-ci dans l'essence de girofle et le xylol, puis monter dans le baume. Sur ces préparations les bactéries sont fortement colorées en rouge sur un fond faiblement rose.

Dans notre édition de 1897, après avoir decrit le *Pseudoinfluenzabacillus* de Pfeiffer, différencié par sa taille un peu plus grande et sa propriété de donner des filaments dans des cultures, nous nous prononcions pour son identité avec le Bacille de l'influenza. Cette identité est aujourd'hui admise par tous les bactériologues et par Pfeiffer lui-même ; il faut également confondre les deux formes A et B décrites par Grassberger. Enfin, Elmassian a étudié un bacille ayant tous les caractères morphologiques de celui de Pfeiffer, mais poussant bien sur agar-ascite; nous accepterions volontiers de confondre les Bacilles de Pfeiffer et d'Elmassian si ce dernier ne se montrait très pathogène pour le cobaye : l'injection de 2 à 4 centimètres cubes de culture en bouillon-sérum de quarante-huit heures tue le cobaye avec une péritonite généralisée et le microbe pullule dans les exsudats péritonéal, péricardique et dans le sang du cœur.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Ensemencement. — Choisir un crachat bien compact, le laver plusieurs fois à l'eau distillée stérile (méthode de Kitasato; Voy. p. 192); prélever purement une petite parcelle au centre du crachat lavé, l'émulsionner dans un peu de bouillon stérile et avec l'émulsion ensemencer en surface des plaques de gélose au sang préparées comme nous le dirons plus loin.

Conditions de culture. — Le Bacille de Pfeiffer ne cultive pas sur les milieux ordinaires; pour se développer il exige la présence d'hémoglobine dans les milieux nutritifs; exclusivement aérobie, il se développe de + 26° à 42°, la température optima étant 37°.

Quand on ensemence sur de la gélose ordinaire une émulsion de crachats préparée comme nous venons de le dire, on obtient d'ordinaire une culture grêle, mais les réensemencements de cette culture sur gélose restent stériles; le crachat avait apporté en petite quantité les matières nécessaires au développement de la première culture; pour les ensemencements successifs il faut employer la gélose ensanglantée. Il est important que la gélose employée soit neutre ou très légèrement alcaline, une faible exagération de l'alcalinité compromettant le résultat des cultures.

Gélose au sang. — La gélose addionnée de sang constitue le milieu le plus favorable à la culture du Bacille de Pfeiffer. Pour la préparer on coule de la gélose liquéfiée dans une boite de Petri, et, après refroidissement, on dépose à la surface du milieu nutritif une grosse goutte de sang que l'on étale en couche aussi mince que possible; on peut encore étaler le sang sur la surface inclinée de la gélose en tube à culture. Les sangs, humain, de lapin, de pigeon, recueillis aseptiquement donnent les meilleurs résultats. La gélose-sang de Bezançon (Voy. p. 55) constitue également un milieu favorable.

L'ensemencement en surface d'une émulsion de crachats donne lieu, dès la vingt-quatrième heure à 37°, à un développement abondant de petites colonies très fines ne pouvant guère êtres vues qu'à la loupe, jamais confluentes et ayant l'aspect de gouttellettes transparentes. De très rares colonies peuvent atteindre les dimensions d'une tête d'épingle. Quelquefois le développement est plus tardif et ne commence que vers le deuxième jour.

Pfeiffer, en réensemençant ces colonies sur des tubes de gélose inclinée recouverte d'une mince couche de sang, a pu obtenir pendant plusieurs mois des passages successifs.

Gélose à l'hémoglobine. — Pfeiffer ayant démontré que, dans le sang, c'est l'hémoglobine qui favorise le développement du Bacille

de l'influenza, Huber a proposé de remplacer dans les cultures le sang par de l'hémoglobine; il a obtenu ainsi des cultures analogues à celle que nous venons de décrire.

Huber utilise l'hémoglobine commerciale du Dr Hommels; ce liquide, de couleur rouge foncé, est additionné de potasse jusqu'à réaction fortement alcaline (pour éviter la coagulation pendant le chauffage), puis stérilisé à 100°. Le produit obtenu est mélangé à de la gélose stérile liquéfiée et refroidie à 50° ou 60°, en quantité suffisante pour que celle-ci prenne une teinte rouge-groseille; on incline les tubes et on les laisse se solidifier. Ce procédé donne en général de mauvais résultats; il en est de même de la gélose additionnée de jaune d'œuf, de Nastikow.

Milieux liquides. — Dans le bouillon additionné de sang de pigeon, le Bacille de la grippe se développe en produisant de légers flocons blanchâtres peu caractéristiques.

Le développement est plus abondant dans le sérum coloré par l'hémoglobine, obtenu en laissant au contact du caillot le sérum du lapin; ce sérum dissout de l'hémoglobine et constitue alors un excellent milieu (Rosenthal).

Le Bacille de Pfeiffer ne cultive pas sur gélose glycérinée; les cultures décrites par Kitasato, celles de Bruschettini et de Canon, n'ont rien de commun avec le Bacille de l'influenza.

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Le Bacille de l'influenza est très sensible à l'action de la chaleur et de la dessiccation. En milieu humide, dans les crachats préservés de la dessiccation, par exemple, il peut garder son activité pendant quatorze jours; au contraire, des crachats ensemencés après une dessiccation de trente-six à quarante heures à la température ordinaire ne donnent pas de culture.

Sur la gélose au sang le bacille vit de sept à douze jours, et trente-huit à quarante jours, d'après Huber, sur la gélose à l'hémoglobine. La dessiccation tue les cultures en deux heures à 37°, et en vingt-quatre heures à la température ordinaire. En repiquant les cultures sur gélose-sang tous les quatre ou cinq jours, on peut conserver le bacille vivant pendant plusieurs mois. En sac de collodion, dans le péritoine du lapin, Dujardin-Beaumetz a pu conserver le microbe vivant pendant près de deux mois.

Agglutination. — Le Bacille de Pfeiffer n'est pas agglutiné par

le sérum des malades atteints d'influenza et présentant le bacille dans les crachats (Meunier).

§ 2. — INFECTIONS SECONDAIRES. — MICROBES FAVORISANTS.

Chez les malades atteints d'influenza, certains microbes peuvent se développer à côté du Bacille de Pfeiffer (1) et créer des complications de la maladie primitive : tels sont le *Streptocoque*, le *Pneumocoque*, et aussi les *Staphylocoques* et le *Colibacille*. Bien plus, ces associations ont une action favorisante sur le Bacille de Pfeiffer dont elles facilitent le développement.

Grassberger a constaté que sur les tubes où il se trouve des colonies de Staphylocoque doré, à côté de celles-ci, les colonies de Bacille de Pfeiffer prennent un développement considérable et deviennent visibles à l'œil nu au bout de vingt-quatre heures. Elles restent transparentes, pâles ou bleutées, leur centre prend parfois un aspect grisâtre, elles sont presque confluentes mais leurs bords ne se confondent pas ; on peut voir de ces colonies géantes d'influenza jusque dans les anfractuosités des colonies de Staphylocoque.

Réensemencées purement sur gélose-sang, ces colonies donnent des cultures filles d'aspect normal, mais conservant leur vitalité plus longtemps que de coutume. De plus, l'association au Staphylocoque fait perdre au Bacille de Pfeiffer sa sensibilité ordinaire à la réaction du milieu et lui permet de pousser, en cultures mixtes, sur des géloses-sang assez fortement alcalines.

Les divers Staphylocoques, et à un moindre degré, le Colibacille, les Bacilles d'Eberth, de Löffler, le Streptocoque, etc., possèdent cette propriété favorisante.

L'action favorisante paraît due à des substances sécrétées par les microbes associés ou à une modification du milieu sous l'influence de ces microbes : en effet, si on stérilise à l'autoclave une culture de Staphylocoque âgée de vingt-quatre heures, sur gélose, puis qu'on coule la gélose dans une boîte de Petri, on obtient sur ce milieu des colonies géantes par ensemencement du Bacille de Pfeiffer après ensanglantement.

Technique. — Il est facile d'obtenir des cultures mixtes démonstratives. On ensemence en nappe du Bacille de Pfeiffer sur des tubes de gélose-sang, on porte pendant trois ou quatre heures ces tubes à l'étuve à 37° pour évaporer l'excès d'humidité et éviter les bavures; au bout de ce temps on pratique une strie fine ou deux ou trois ensemencements punctiformes avec le Staphylocoque. Les colonies

(1) Sur trente cas d'influenza observés par Grassberger, six fois seulement le Bacille de Pfeiffer se rencontrait en culture pure.

géantes se développent en satellites autour de la culture de Staphylocoque. Rosenthal propose d'utiliser cette action favorisante du Staphylocoque dans les cas où la recherche du Bacille de Pfeiffer donne des résultats douteux : quand les tubes ensemencés avec des crachats ou du sang restent stériles au bout de vingt-quatre heures, on surpique une strie étroite de Staphylocoque : cette épreuve peut mettre en évidence le bacille resté latent.

Réciproquement, d'après Rosenthal, le Bacille de Pfeiffer aurait une action favorisante vis-à-vis du Pneumocoque : une culture pure de Pneumocoque sur agar-sang ne se repique pas après quelques passages ; tandis que, sur le même milieu, le Pneumocoque mélangé au Bacille de Pfeiffer est susceptible d'être réensemencé presque indéfiniment.

CHAPITRE XXIV

LE BACILLE DE LA PESTE

Le Bacille de la peste a été découvert simultanément par Yersin et par Kitasato.

La peste humaine revêt d'ordinaire la forme bubonique, mais on peut aussi observer une peste sans bubons, à forme pneumonique. Dans la peste bubonique on trouve le bacille dans le pus des ganglions, parfois dans le sang, rarement dans les fèces (Wilm). Dans la forme pneumonique le bacille se montre dans la pulpe des ganglions, en l'absence de tout bubon, fréquemment dans le sang, et toujours dans les crachats ; Métin a trouvé les bacilles dans les crachats jusqu'au huitième jour après la déferves-cence ; mais à ce moment on ne peut les déceler que par l'inoculation et leur virulence est atténuée ; au neuvième jour ils ont complètement disparu. On rencontre également les bacilles dans le suc et les coupes du poumon et de la rate (Tchistowitch).

Dans les épidémies de peste un grand nombre d'animaux (rats, souris, buffles, porcs, mouches) sont frappés en même temps que les hommes. Les rats sont d'ordinaire les premiers frappés : « La peste, qui est d'abord une maladie des rats, devient bientôt une maladie de l'homme (Roux et Yersin). »

Il semble que la peste se transmet du rat au rat et du rat à l'homme par l'intermédiaire de parasites communs : les puces (Simond). La puce du rat passe facilement à l'homme ; les rats malades se laissent envahir par les puces et dans le tube stomacal de ces parasites on trouve des Bacilles pesteux ; une puce de rat pesteux broyée et inoculée à une souris lui donne la peste ; un rat sain mis en contact avec des puces de rat pestiféré meurt de la peste. Après la mort du rat les puces émigrent et quittent le cadavre.

D'homme à homme la peste peut se transmettre également par les puces, peut-être aussi par les punaises ; dans la peste on observe parfois des phlyctènes précoces, dont le volume varie entre la taille d'une tête d'épingle et celle d'une noix, transparentes d'abord, puis purulentes et contenant toujours le bacille ; il semble que ces phlyctènes révèlent la porte d'entrée du virus, elles se manifestent sur les régions exposées aux piqûres des parasites ; Sticker, à Bombay, s'étant piqué avec un scalpel souillé par du virus pesteux, eut une phlyctène au point lésé, au bout de trois jours, puis la peste se déclara.

Les mouches, frappées en grand nombre et dont les cadavres contien-

nent le Bacille pesteux (Yersin), peuvent aussi jouer un rôle dans la propagation de la peste. Il semble que l'homme prenne rarement la peste par les voies digestives; cependant Wilm a cité des cas où les symptômes intestinaux dominaient et où, à l'autopsie, on trouvait un bubon interne développé dans les ganglions mésentériques.

L'infection par les voies respiratoires, facilement réalisable chez les animaux, n'est pas rare chez l'homme, elle paraît la seule en cause dans les épidémies à forme pneumonique (Balzaroff).

Le bacille peut conserver son activité dans les milieux extérieurs: Yersin a trouvé un Bacille pesteux, moins virulent à la vérité que celui des bubons, dans le sol d'une localité infectée.

Hankin résume nos connaissances sur l'étiologie de la peste en disant que, si le rôle du rat comme agent vecteur est incontestable dans nombre d'épidémies évoluant dans un cercle limité, c'est l'homme qui fait la propagation aux grandes distances.

Article I. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

§ 1er. — RÉCEPTIVITÉ, SYMPTÔMES ET LÉSIONS.

Le singe, la souris, le rat, le cobaye, le lapin sont très réceptifs; le cheval, le chien, le chat, le bœuf, la chèvre et le mouton sont moins sensibles; les oiseaux sont réfractaires; cependant le pigeon succombe à l'inoculation de fortes doses de cultures virulentes.

Inoculation sous-cutanée. — Chez le singe une légère excoriation faite à la peau avec une aiguille chargée de virus suffit pour conférer la peste (Wyssokowitch et Zabolotnie).

La souris, le rat, succombent en vingt-quatre à soixante-douze heures, le cobaye en deux à cinq jours.

Chez le cobaye, peu d'heures après l'inoculation apparaît un œdème localisé au niveau du lieu de l'injection, puis les ganglions voisins se tuméfient; au bout de vingt-quatre heures, le poil se hérisse, l'animal tombe bientôt sur le côté et présente des crises convulsives qui se répètent jusqu'à la mort.

A l'autopsie, on trouve un œdème rosé au point d'inoculation et au pourtour du ganglion voisin, qui lui-même est volumineux et renferme de nombreux bacilles. Les organes abdominaux sont congestionnés, la rate très volumineuse présente souvent une éruption de petits tubercules miliaires; quand la maladie s'est prolongée, on trouve parfois des abcès de la paroi abdominale. Dans la plèvre et le péritoine, il existe un peu de sérosité contenant le bacille. Nombreux bacilles dans les ganglions, le foie, la rate et le sang.

Les passages de cobaye à cobaye faits à l'aide de la pulpe de rate ou du sang, exaltent la virulence du microbe. — En faisant des séries de passages, on arrive à obtenir des bacilles de virulence fixe pour l'espèce animale sur laquelle on opère; on arrive par exemple à tuer régulièrement la

souris en deux jours, le cobaye en deux ou trois jours, le lapin en trois jours. Le microbe tuant la souris en deux jours demande, lorsqu'on l'inocule à un lapin, un temps assez long pour tuer l'animal ; au bout de quelques passages, il finit par tuer régulièrement le lapin en trois jours, mais alors il a perdu de sa virulence envers la souris et il faut quelques passages de souris à souris pour la lui rendre (Yersin, Calmette et Borrel).

Inoculation intraveineuse. — Elle est plus sévère que l'inoculation sous-cutanée. Les symptômes sont analogues, mais il ne se produit pas de lésion locale.

Inoculation intrapéritonéale. — Elle est très sévère; le cobaye succombe en vingt-quatre ou quarante huit heures. Les passages en série, en sacs de collodion, dans le péritoine du cobaye exaltent la virulence du bacille (Roux).

Inoculation par les muqueuses. — Toutes les muqueuses (nasale, conjonctivale, buccale, rectale, vaginale, etc.) se prêtent à l'inoculation du virus pesteux.

Les rats, cobayes et lapins prennent une peste mortelle quand on dépose sur leur muqueuse nasale, et sans l'excorier, une trace de virus; on peut ainsi transmettre la maladie plus sûrement que par l'inoculation sous-cutanée (Roux et Balzaroff).

Le virus pesteux affaibli et ne tuant plus par inoculation hypodermique donne une pneumonie pesteuse quand on l'inocule dans les voies respiratoires, et reprend sa virulence par des passages successifs sur la muqueuse nasale; desséché dans des matières albuminoïdes, le virus donne, même après plusieurs semaines, une pneumonie pesteuse quand on l'inocule par la voie nasale.

L'ingestion est moins efficace : le rat et le singe prennent difficilement la peste par les voies digestives ; l'infection n'est possible qu'avec un virus très actif (Simond).

En plaçant dans le même local des souris saines et des souris inoculées, Yersin a constaté que les souris saines prenaient la peste et succombaient toutes avec les lésions caractéristiques.

§ 2. — RECHERCHE ET DIAGNOSTIC.

Chez le vivant on recherche le Bacille de la peste dans le pus des bubons (1), la lymphe ganglionnaire, le sang, les crachats ; quand il n'existe pas de bubons, les ganglions renferment néanmoins le Bacille : on enlève un ganglion et on le soumet aux épreuves que nous décrivons ci-dessous.

(1) Dans le pus des bubons le Bacille pesteux est parfois associé aux différents Staphylocoques, au Colibacille, etc).

Sur le cadavre on recherche en outre le bacille dans la rate, le poumon, les reins, etc.

La recherche sera conduite de la façon suivante :

1. *Examen microscopique.* — Préparer des frottis sur lame avec la pulpe de ganglion, de rate, etc. ; fixer à l'alcool-éther; colorer au violet phéniqué, faire subir l'épreuve du Gram qui devra rester négative.

2. *Cultures.* — Ensemencer la pulpe ganglionnaire ou viscérale sur des tubes de gélose inclinée; mettre à l'étuve à 37°.

3. *Inoculations.* — Inoculer à la souris un peu de pulpe ganglionnaire ou une öse de culture sur gélose ; en cas de peste, la mort se produit du deuxième au quatrième jour; rechercher le bacille dans le sang, la rate, etc.

ARTICLE II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le microbe de la peste est un bacille court, trapu, dont les extrémités sont arrondies, ou plus exactement un coccobacille. Sa largeur mesure environ 1μ, sa longueur dépasse rarement 2 μ. Il est immobile. Il est excessivement abondant dans la pulpe des bubons ; dans le sang, il est un peu plus allongé que dans les bubons.

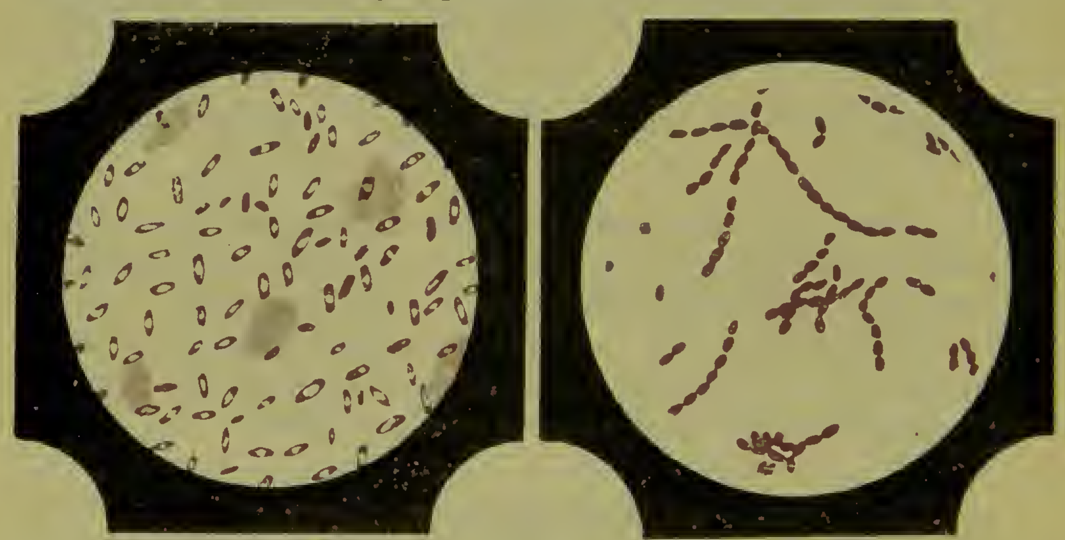


Fig. 212. — Bacille de la peste. — Frottis de ganglion (d'après Yersin).

Fig. 213. — Bacille de la peste. — Culture en bouillon (d'après Yersin).

Dans les cultures, il se groupe en chaînettes et présente parfois de place en place de gros renflements en boule; sur la gélose, à côté de ces formes, on peut rencontrer de grosses chaînes constituées par des bâtonnets accolés latéralement. Les formes renflées sont plus nombreuses dans les cultures anciennes; elles colorent mal.

Coloration. — Le Bacille de la peste se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline, les solutions de violet et de thionine phéniqués conviennent bien; il ne se colore pas par la méthode de Gram.

Le bacille se colore plus fortement aux extrémités qu'au centre, de sorte qu'il présente souvent un espace clair en son milieu. Quelquefois les bacilles semblent entourés d'une capsule.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Bacille pesteux est aérobie. Il cultive aisément dans les milieux ordinaires, légèrement alcalins. Le développement commence vers + 5°, se fait rapidement à 20° et mieux à 35°-37°.

Bouillon. — La culture prend un aspect très analogue à celui des cultures de Streptocoque, des grumeaux adhèrent aux parois, le liquide restant clair, puis les grumeaux se précipitent au fond du tube.

D'après Yersin, la solution alcaline de peptone à 2 p. 100 additionnée de 1 à 2 p. 100 de gélatine constitue le milieu le plus favorable.

Gélatine. — Le Bacille pesteux ne liquéfie pas la gélatine. Les *colonies isolées* se développent en deux à quatre jours; elles sont rondes, granuleuses, jaunâtres, et s'entourent parfois d'une zone transparente à bords irrégulièrement découpés. — La *piqûre* produit, à la surface une tache jaunâtre mi-transparente, dans la profondeur une ligne blanchâtre.

Gélose. — Gélose glycérinée. — Sérum. — L'ensemencement de pulpe de bubon donne lieu au développement de colonies blanches, transparentes, présentant des bords irisés quand on les examine à la lumière réfléchie. Le repiquage produit en vingt-quatre heures un enduit gluant, blanc laiteux.

Lait. — Développement grêle; pas de coagulation.

Pomme de terre. — Développement lent d'une légère strie blanche, parfois jaunâtre.

ARTICLE III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Le Bacille de la peste est très fragile dans les cultures; un séjour d'une heure à 58° stérilise les cultures; il en est de même de l'exposition à 100° pendant une minute; les antiseptiques en solutions faibles (acide phénique 1 p. 100, sublimé 1 p. 1 000, etc.), tuent rapidement les cultures.

Dans le pus, le Bacille pesteux est plus résistant ; il conserve pendant plusieurs semaines sa vitalité et sa virulence dans le pus desséché ; le bacille peut se conserver vivant dans le sol pendant un et même deux mois, sa virulence est alors atténuée mais peut reparaître par la suite. La putréfaction fait disparaître en quinze à trente jours le Bacille pesteux des cadavres (Yokoté).

La virulence du bacille baisse et disparaît rapidement dans les cultures successives. Yersin a constaté que la pulpe des bubons ensemencée sur gélose donne des colonies de différente virulence : certaines de ces colonies, plus volumineuses, sont très peu virulentes, leur développement est beaucoup plus rapide que celui des colonies virulentes, si bien qu'elles finissent par étouffer celles-ci et que les cultures successives perdent rapidement de leur activité. Nous avons vu plus haut que l'on peut restituer sa virulence au bacille atténué (Voy. art. I).

§ 2. — TOXINE.

Les cultures filtrées se montrent peu toxiques (Yersin, Calmette et Borrel). Markl montre que le poison reste adhérent au corps des microbes, aussi faut-il utiliser pour la préparation de la toxine des cultures âgées de plusieurs semaines.

Roux a obtenu une toxine très active en utilisant le bacille exalté par cultures en sacs de collodion dans le péritoine du cobaye; ce bacille, cultivé en bouillon gélatinisé à 0gr,5 p. 100, donne une toxine qui tue la souris en moins de douze heures à la dose de 1/70e de centimètre cube, mais qui est peu active pour le lapin et le cobaye.

Roux, laissant macérer pendant plusieurs semaines, sous le toluol, des cultures ainsi préparées, puis les filtrant au papier et les précipitant par le sulfate d'ammoniaque, obtient une poudre qui tue la souris à la dose d'un quart de milligramme.

La toxine pesteuse est très peu stable, elle s'altère à 70° et est rapidement détruite par l'air et la lumière.

§ 3. — VACCINATION.

Roux, Yersin, Calmette et Borrel ont entrepris une série de recherches sur la vaccination antipesteuse. Les inoculations de toxine, même très active, n'arrivent pas à conférer aux animaux une immunité active absolue et durable et ne permettent pas d'obtenir un sérum antipesteux.

Les injections de bacilles tués par la chaleur se montrent plus

efficaces. Yersin, Calmette et Borrel raclent des cultures sur gélose, les délayent dans une petite quantité de bouillon qu'ils enferment en tubes scellés et chauffent une heure à 58°. Le produit obtenu, inoculé à haute dose dans les veines ou le péritoine, tue le lapin ; mais une ou deux injections dans les veines ou le péritoine d'une quantité suffisante pour rendre les animaux malades sans les tuer, vaccinent contre l'inoculation sous-cutanée du bacille vivant et virulent, à la condition que cette inoculation soit faite alors que l'animal est parfaitement rétabli de l'injection vaccinale.

On peut aussi vacciner le lapin par injection sous-cutanée de cultures chauffées, mais le procédé est plus long : il faut, en général, trois ou quatre injections faites de quinze jours en quinze jours.

Le cobaye est beaucoup plus difficile à vacciner et on réussit rarement à lui conférer une immunité complète.

Le cheval est assez difficile à immuniser; on ne peut y parvenir par l'injection de toxine; les inoculations de cultures tuées par la chaleur sont peu actives et agissent lentement; le procédé le plus efficace consiste à injecter des doses croissantes de cultures vivantes, mais la pratique de ces injections n'est pas sans danger.

Le cheval réagit vivement à l'inoculation sous-cutanée d'un quart de culture vivante sur gélose ; il présente une élévation considérable de la température centrale et une tuméfaction notable suivie de la formation d'un abcès au point d'inoculation.

Pour obtenir l'immunisation, il est préférable d'injecter le virus dans les veines. Le cheval reçoit un quart de culture de gélose dans la jugulaire ; la réaction est intense et dure plusieurs jours. Quand l'animal est parfaitement rétabli, le vingtième jour environ, on répète les injections à doses de plus en plus fortes, mais à intervalles éloignés. Les animaux maigrissent beaucoup pendant l'immunisation et il faut avoir soin de ne pas précipiter les inoculations.

Chez l'homme, Haffkine obtient la vaccination au moyen de cultures virulentes tuées par un chauffage d'une heure à 70° ; il injecte sous la peau 2 à 3 centimètres cubes d'une culture en bouillon ainsi traitée; après l'inoculation il se produit une fièvre éphémère et un peu de lymphangite au pourtour du lieu d'injection, l'immunité est acquise au bout de huit à dix jours et dure environ deux semaines ; en mélangeant au virus un peu de sérum antipesteux, on diminue la réaction et on confère de suite une immunité qui pourrait permettre d'attendre l'effet du vaccin.

§ 4. — SÉROTHÉRAPIE.

Chez l'homme guéri de la peste, le sérum se montre légèrement curatif et préventif (Métin).

Le sérum des lapins immunisés est préventif et curatif : à la dose de 3 centimètres cubes, il préserve un lapin neuf contre l'inoculation sous-cutanée de peste virulente ; à la même dose, il arrête l'infection et guérit l'animal, quand il est injecté douze heures après une inoculation du virus.

Le sérum, recueilli trois semaines après la dernière injection sur des chevaux immunisés par Roux selon le procédé décrit plus haut, se montre anti-infectieux et antitoxique. Un vingtième de centimètre cube de ce sérum préserve la souris contre une dose de virus capable de la tuer en trois jours ; un quart de centimètre cube la guérit quand il est injecté douze heures après l'inoculation virulente.

Le sérum antipesteux agglutine le bacille dans les cultures en bouillon.

Applications thérapeutiques. — Les observations de Yersin, Calmette et Salimbeni, Métin, etc., ont montré l'efficacité du sérum antipesteux dans la maladie humaine. L'injection de 5 à 10 centimètres cubes du sérum de l'Institut Pasteur confère immédiatement une immunité qui dure environ quinze jours.

La dose thérapeutique est de 40 à 300 centimètres cubes injectés en une ou plusieurs fois sous la peau, ou mieux dans une veine. L'injection de sérum est d'autant plus efficace qu'elle est pratiquée à un moment plus rapproché du début de la maladie; la dose doit être plus considérable chez les malades atteints depuis plusieurs jours.

CHAPITRE XXV

LE BACILLE DE LA MORVE

Le Bacille de la morve a été découvert simultanément par Löffler et Schütz et par Bouchard, Capitan et Charrin.

La morve s'observe presque toujours chez les solipèdes. L'homme est rarement atteint ; il prend la morve du cheval ; quelquefois l'homme a contracté la morve en maniant des cultures du Bacille de Löffler-Schütz ; ces cultures sont très virulentes et très dangereuses à manier (cas de Kalning, Protopopoff, etc.).

On a observé également la morve spontanée chez des carnassiers, lions et tigres, qui avaient été nourris avec des viandes morveuses.

Suivant que les localisations du Bacille de Löffler-Schütz prédominent sur les organes internes ou sur la peau, on distingue cliniquement la *morve* et le *farcin*. La morve, plus fréquente que le farcin, est caractérisée par l'envahissement de la muqueuse nasale (*chancres* de la pituitaire, *jetage*), des ganglions lymphatiques (*glande*), puis des viscères, en particulier du poumon et des organes génitaux ; la morve peut être aiguë ou chronique. Le farcin, aigu ou chronique, a pour principales lésions des abcès cutanés ou boutons farcineux qui aboutissent à des chancres, des lymphangites, et quelquefois le sarcocèle morveux. On n'observe jamais le passage des formes aiguës aux formes chroniques. Il ne faut pas confondre avec cette maladie le *farcin du bœuf*, affection très différente, non transmissible à l'homme et due à un streptothrix.

Article I. — MORVE EXPÉRIMENTALE.

Ane. — L'âne est de tous les animaux le plus sensible à la morve ; après l'inoculation, il prend d'ordinaire la morve aigüe ; cependant Arloing a observé une fois la morve chronique chez cet animal, après inoculation.

On inocule ordinairement l'âne en pratiquant quelques scarifications sur la peau du front et en frottant la surface scarifiée avec la matière morveuse (pus, jetage, etc.). Il se produit rapidement de l'œdème, puis une ulcération au niveau des stries d'inoculation ; la température s'élève, atteint 40° et 41° ; les ganglions voisins s'en-

gorgent, le jetage apparaît et l'animal succombe en quelques jours.

A l'autopsie : boutons morveux n'ayant souvent pas eu le temps de s'ulcérer, sur les muqueuses nasale et laryngo-trachéale ; le poumon est farci de petits infarctus, dont la pression fait sourdre des gouttelettes de pus épais, blanchâtre, très virulent. Ces infarctus peuvent se retrouver sur le foie, les reins, la rate, etc.

Mulet, Cheval. — Le mulet est plus réceptif que le cheval. Chez ces animaux l'inoculation cutanée donne lieu d'ordinaire à une morve subaiguë ou chronique. La température s'élève peu ou reste normale, le jetage s'établit, les ganglions de l'auge se tuméfient, on note quelquefois des râles, de l'essoufflement, mais les symptômes peuvent rester peu accusés pendant longtemps. A l'autopsie, on trouve des chancres de la pituitaire et, dans le poumon, des tubercules morveux apparaissant sous forme de petits points grisâtres avec un liséré de congestion ; le point grisâtre est constitué par une coque fibreuse contenant une gouttelette de pus.

Cobaye. — Le cobaye est très sensible à la morve ; il doit être placé après l'âne dans l'échelle de réceptivité.

Quand on se trouve en présence d'un virus morveux pur, il est préférable d'inoculer le cobaye dans le péritoine : l'affection se développe avec une marche très caractéristique.

En présence d'un produit impur, l'inoculation dans le péritoine exposerait au développement d'une péritonite banale. Mieux vaut alors inoculer un premier cobaye sous la peau ; il ne tarde pas à se former un abcès morveux au point d'inoculation ; les ganglions voisins se tuméfient. On prélève un de ces ganglions et on en broie une partie avec un peu d'eau stérile ; l'émulsion obtenue est inoculée dans le péritoine d'un second cobaye.

Inoculation par scarifications et inoculation sous-cutanée. — L'inoculation par scarifications doit être pratiquée de préférence sur le dos ; l'inoculation sous-cutanée est pratiquée à la base de la cuisse. Dans le premier cas, il se produit un chancre au niveau du point d'inoculation ; dans le second, on assiste à l'évolution d'un abcès et d'une lymphangite morveuse ; les ganglions voisins se tuméfient et peuvent même s'abcéder. L'animal ne tarde pas à maigrir et succombe au bout d'un à deux mois.

Souvent, chez les cobayes mâles, il se produit une lésion assez caractéristique, le *sarcocèle* morveux : vers le second septénaire, les testicules deviennent énormes, la peau du scrotum, d'abord rouge et tendue, ne tarde pas à s'ulcérer, il s'y développe de petits chancres ; la vaginale est primitivement intéressée, elle devient adhérente au testicule et s'infiltre de petits abcès miliaires.

Le poumon, le foie, la rate, les ganglions sont plus ou moins envahis par de petits tubercules miliaires à centre purulent.

Inoculation intrapéritonéale. — Doit être pratiquée sur un cobaye mâle ; la lésion pathognomonique est le développement d'un sarcocèle morveux, le deuxième ou le troisième jour après l'inoculation ; la mort arrive rapidement, d'ordinaire au cours de la deuxième semaine ; quand le virus est très actif (cultures par exemple) et que l'on injecte une dose un peu forte, la mort peut survenir en deux ou trois jours sans lésions nodulaires, par septicémie.

Souris des champs. — Cet animal est très sensible à la morve ; à la suite de l'inoculation sous-cutanée, la mort survient au cours de la première semaine. Les viscères et particulièrement la rate sont gorgés de granulations morveuses.

Spermophile. — Très sensible à la morve ; succombe pendant la première semaine avec généralisation viscérale.

Gamaléia a montré que les passages en série chez le spermophile exaltent la virulence du Bacille de la morve ; le bacille ainsi exalté tue en deux à trois jours par un processus septicémique.

Chat. — Le chat est très sensible à la morve ; à la suite de l'inoculation cutanée, il se produit un chancre ; la mort survient en quinze à trente jours ; les viscères sont envahis par les nodules morveux.

Mouton, Chèvre. — Prennent aisément la morve expérimentale.

Chien. — Le chien prend difficilement la morve. Chez le jeune chien seul, la maladie se généralise et la mort arrive rapidement (Galtier). L'inoculation par le procédé des scarifications entraîne chez le chien adulte le développement d'une lésion locale caractéristique. On pratique l'inoculation sur le front ; au bout de trois à cinq jours, la région s'œdématie et il se produit des ulcérations, entourées d'une auréole de congestion ; on se trouve en présence de chancres morveux d'où s'écoule une sanie très virulente. Les chancres progressent une à deux semaines, puis restent stationnaires et se cicatrisent ; la guérison est alors complète. Cependant Nocard a observé chez le chien des cas de mort par morve chronique.

On peut vaincre la résistance du chien vis-à-vis du Bacille morveux.

1° Trasbot inocule à deux chiens du pus provenant d'un lion morveux et voit succomber les deux animaux ; il en conclut que le passage par le lion exalte la virulence du bacille.

2° Straus injecte dans une veine une dose massive de culture morveuse ; l'animal maigrit, présente du farcin (nodosités sous-cutanées, chancres) et succombe avec envahissement de ses organes par les tubercules morveux.

3° Tedeschi a triomphé de la résistance du chien en pratiquant l'inoculation des cultures dans le tissu nerveux (cerveau, moelle, nerfs).

Lapin. — Le lapin est très peu réceptif : d'ordinaire l'inoculation sous-cutanée entraîne le développement d'un chancre qui guérit spontanément. Löffler a pu obtenir une infection généralisée aboutissant à la mort, par injection intraveineuse de cultures à doses massives. Gamaléia, par des passages en séries sur le spermophile, a obtenu un virus tuant le lapin par injection sous-cutanée.

Souris blanche, Rat. — Sont réfractaires à la morve.

Bovidés, Suidés. — Sont réfractaires à la morve. Spinola cependant a réussi à infecter le porc; Cadéac et Mallet ont montré que cet animal devient réceptif quand sa résistance a été affaiblie par une maladie antérieure.

Oiseaux. — Sont réfractaires à la morve.

Article II. — RECHERCHE ET DIAGNOSTIC.

Répartition du bacille dans l'organisme morveux. — Le pus morveux, la sanie des chancres, le jetage, contiennent le Bacille de Löffler-Schütz. On trouve de même le bacille dans les boutons, tubercules, infarctus morveux.

Le système lymphatique est le siège d'élection du bacille, les ganglions sont d'ordinaire rapidement envahis, mais ce n'est pas là une règle absolue et Nocard a constaté que les ganglions tuméfiés de l'auge n'étaient pas toujours virulents.

Chez l'animal, on ne trouve pour ainsi dire jamais le Bacille morveux dans le sang (Nocard) ; cependant dans les formes très aiguës les inoculations ont permis à Lixteyn et à Preusse d'y déceler sa présence. Chez l'homme, le microbe se trouve moins rarement dans le sang (Löffler, Goutchakoff, Sittmann).

La salive, les urines, le sperme, la sueur ont été quelquefois trouvés virulents ; le lait ne le serait dans aucun cas.

Quoi qu'il en soit, la recherche du bacille par l'examen microscopique donne souvent des résultats négatifs, même dans les frottis de pus et de tubercules morveux ; l'inoculation et l'ensemencement seuls permettent d'affirmer la présence ou l'absence du Bacille de Löffler. Cette impuissance de l'examen microscopique à révéler la présence du bacille est surtout marquée dans les lésions chroniques (particulièrement chez le cheval) ; pour obtenir des préparations démonstratives, on devra avoir recours au pus des chancres du chien, au sarcocèle morveux du cobaye, aux lésions aiguës de l'âne, etc.

Technique de la recherche. — Le diagnostic de la morve

est souvent malaisé ; l'expérimentation doit venir en aide à la clinique.

Le diagnostic précoce dans les cas de morve latente était impossible il y a encore peu d'années; aujourd'hui nous possédons un procédé précieux de diagnostic dans l'emploi de la malléine, sur laquelle nous aurons à revenir plus loin. Pour le moment, nous indiquerons seulement la marche à suivre quand on veut rechercher la présence du Bacille de la morve dans un produit pathologique.

I. **Examen microscopique.** — L'examen sera pratiqué sur des frottis préparés avec le pus, les sanies, les pulpes d'organes, etc. Ces frottis seront colorés par les méthodes que nous exposerons plus loin. Le Bacille de la morve ne prend pas le Gram. Les fragments d'organes destinés à être coupés seront durcis à l'alcool absolu et inclus dans la paraffine. Nous rappellerons ce qui a été dit plus haut sur le peu de valeur des résultats négatifs de l'examen microscopique.

II. **Cultures.** — Le pus, les pulpes d'organes, recueillis purement, seront toujours ensemencés sur pomme de terre. L'aspect de la culture du Bacille de Löffler-Schütz sur pomme de terre est absolument caractéristique et constitue un important élément de diagnostic. Les ensemencements devront être pratiqués en surface sur plusieurs pommes de terre, pour isoler les germes qui pourraient exister dans le produit à l'état d'impuretés.

III. **Inoculations.** — Avant la découverte de la propriété que possède la malléine de provoquer une réaction chez les animaux morveux, les inoculations pratiquées avec le pus, le jetage, etc., étaient le procédé le plus certain de diagnostic de la morve. Nous avons dit que les inoculations de ganglions pouvaient rester négatives, même quand le cheval porteur de ces ganglions est réellement atteint de morve. Les inoculations destinées à fixer le diagnostic se font au cobaye, à l'âne et au chien.

1° *Cobaye.* — L'inoculation des produits suspects dans le péritoine du cobaye a été recommandée par Straus comme le moyen le plus simple et le plus certain de diagnostiquer la morve. Ce procédé exige l'emploi de produits purs, ne contenant pas les microbes de la suppuration ou d'autres bactéries capables de déterminer une péritonite chez le cobaye. Dans la moitié des cas environ, les cobayes inoculés dans le péritoine avec du jetage suspect, meurent en vingt-quatre à trente-six heures par péritonite septique.

Si l'on est en présence de produits souillés, on pourra opérer comme nous l'avons dit plus haut: l'inoculation sera d'abord faite sous la peau d'un cobaye et une parcelle de ganglion de cet animal servira à pratiquer les inoculations intrapéritonéales. Mais il est souvent

plus aisé et plus rapide, en pareil cas, de pratiquer les inoculations chez l'âne ou le chien.

Pour pratiquer l'inoculation, un peu de pus, de jetage, ou de suc glandulaire est délayé dans de l'eau stérile, puis injecté dans le péritoine : le *sarcocèle morveux* apparaît dès le deuxième ou troisième jour; la mort survient du huitième au quinzième jour.

Le signe de Straus a passé longtemps pour pathognomonique; le développement chez le cobaye du sarcocèle morveux, après inoculation intrapéritonéale d'un produit pathologique, était considéré comme une preuve absolue de la nature morveuse de ce produit. Mais Kutscher a isolé du jetage d'un cheval morveux un microbe très différent du Bacille de Löffler-Schütz, et dont l'inoculation intrapéritonéale provoque chez le cobaye une orchite cliniquement semblable à l'orchite morveuse; Hallopeau et Bureau ont obtenu une orchite semblable en inoculant dans le péritoine du cobaye le pus provenant d'un homme atteint de mycosis fongoïde. Nocard enfin a observé chez le cheval dix-neuf cas de lymphangite d'apparence farcineuse et dus à un bacille dont l'inoculation intrapéritonéale chez le cobaye produit le sarcocèle : or, ce bacille n'a rien de commun avec celui de la morve ; il en diffère par la forme des cultures et par sa propriété de prendre très bien le Gram ; d'ailleurs, la lymphangite pseudo-farcineuse de Nocard semble très peu contagieuse. L'inoculation dans le péritoine du cobaye n'est donc qu'un élément du diagnostic; elle doit toujours être suivie de l'examen microscopique du pus du sarcocèle et être accompagnée de l'épreuve par la malléine (Nocard).

2° *Ane.* — La sensibilité de l'âne en fait un réactif précieux pour le diagnostic de la morve. On l'inocule par la méthode des scarifications ; quand le produit inoculé est de nature morveuse, l'âne présente toujours les symptômes caractéristiques de la morve avant la fin du deuxième septénaire; cependant, dans un cas d'Arloing, l'âne inoculé avec le produit suspect ne présenta aucun symptôme de morve; on le sacrifia au bout de trois mois et on trouva, à l'autopsie, des lésions de morve chronique.

3° *Chien.* — L'inoculation de produits morveux par scarification sur la peau du front, entraîne d'ordinaire le développement de chancres morveux, mais cette réaction ne présente pas une constance suffisante pour qu'on puisse l'adopter pour baser un diagnostic.

Article III. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Bacille de la morve a l'aspect de petits bâtonnets droits ou légèrement incurvés, ayant à peu près la longueur des Bacilles tuberculeux (3 à 5 μ), mais plus épais que ces derniers. Leurs extrémités sont arrondies. Ils sont mobiles dans les cultures en milieux

artificiels. Dans les cultures, ils sont isolés ou associés par deux; dans les tissus et le pus, on les rencontre parfois en petits amas; dans les vieilles cultures, on voit des formes d'involution: bacilles filamenteux irrégulièrement renflés, et chaînettes de grains analogues à des coccus.



Fig. 214. — Bacille de la morve (sarcocèle morveux, frottis). — Thionine phéniquée (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. IV).

Coloration. — Le Bacille de Löffler-Schütz se colore par les couleurs basiques d'aniline, mais il a peu d'affinité pour les solutions aqueuses de ces couleurs; pour obtenir de bonnes préparations, on doit employer des solutions mordancées: bleu de Löffler, bleu de Kühne, thionine ou violet phéniqués, fuchsine de Ziehl, etc. Il ne prend pas le Gram.

Dans les préparations colorées, le bacille présente un aspect granuleux, son protoplasma fixe irrégulièrement la matière colorante et présente des espaces incolores; ces parties incolores ne correspondent pas à des spores.

Coupes. — Pour colorer le bacille dans les coupes, on peut utiliser le procédé au tannin de Nicolle ou un des procédés suivants :

Procédé de Kühne. — 1° Les coupes au sortir de l'alcool sont lavées à l'eau, puis colorées pendant quelques minutes dans le bleu phéniqué (Voy. p. 139).

2° Traiter les coupes très rapidement par la solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1 p. 100. Laver à l'eau.

3° Déshydrater très rapidement par l'alcool et l'huile d'aniline; laver avec soin au xylol.

4° Monter dans le baume.

Procédé de Löffler. — 1° Colorer pendant quelques minutes dans de la fuchsine anilinée (préparer comme le violet aniliné) et additionnée de 1 p. 10 000 de potasse caustique.

2° Laver rapidement dans l'acide acétique à 1 p. 100. Laver à l'eau.

3° Déshydrater très rapidement par l'alcool et l'huile d'aniline; laver avec soin au xylol.

4° Monter dans le baume.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Bacille de la morve est aérobie ; il ne cultive guère qu'à partir de +25°, sauf sur la gélose glycérinée ou additionnée de blanc d'œuf où il donne un développement grêle à partir de 23°-24° ; la culture s'arrête à partir de 42°. La température optima est de 35°-38°.

Bouillon. — A 37°, dès la vingt-quatrième heure, il se produit un trouble, puis un précipité blanc, muqueux, non caractéristique.

Gélose. — **Gélose glycérinée.** — Dès la vingt-quatrième heure apparaît le long de la strie d'inoculation une mince bande blanchâtre, à demi transparente, s'épaississant et devenant opaque par la suite. — Sur gélose glycérinée la culture est plus abondante et peut envahir toute la surface du milieu de culture.

Sérum solidifié. — Le sérum du cheval est plus favorable que celui du bœuf. Dès le deuxième jour apparaissent des colonies semi-transparentes devenant blanches et opaques en vieillissant.



Fig. 215. — Bacille de la morve. — Culture sur pomme de terre au septième jour.

Gélatine. — Sur de la gélatine à 12 ou 15 p. 100, restant solide à 25°, on obtient une culture très grêle, à peine visible après plusieurs jours d'exposition à 25°.

Pomme de terre. — Culture caractéristique. Elle se fait mieux sur les pommes de terre riches en amidon ou préalablement alcalinisées (Voy. p. 57).

Dès le deuxième jour à 37°, apparaît le long de la strie d'inoculation un enduit jaunâtre, épais et visqueux ; les jours suivants, la culture s'étend, brunit et prend finalement une teinte chocolat clair ; autour d'elle, la pomme de terre devient noirâtre (fig. 215).

Article IV. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Vitalité. — Le Bacille de la morve est très fragile. Les cultures meurent dès la fin du premier mois. Les cultures sont stérilisées par une exposition de quelques minutes à 60° et même à 55°.

Dans le pus, la dessiccation tue rapidement le bacille : du pus morveux étalé en couche mince et abandonné quarante-huit heures à la température ordinaire perd toute activité. Dans la profondeur des organes, le bacille résiste mieux, mais une exposition de quelques minutes à 100° le tue toujours dans le pus et les viscères.

Le Bacille de Löffler-Schütz est très sensible à l'action des antiseptiques : le sublimé acide à 1 p. 1 000, les solutions d'acide phénique, de crésyl à 3 ou 4 p. 100 le tuent en quelques minutes.

Virulence. — Dans les cultures, la virulence du Bacille de la morve disparaît dès le huitième jour.

Dans les cultures en série sur les milieux artificiels, la virulence disparaît assez rapidement ; elle est très amoindrie dès le cinquième ou le sixième passage.

On obtient facilement l'exaltation du Bacille morveux par les inoculations en série chez certains animaux (Voy. Art. 1).

Trasbot a cité des faits semblant prouver l'exaltation du virus par le passage chez le lion.

Gamaléia a obtenu une exaltation considérable de la virulence du bacille par les passages chez le spermophile : le bacille devient capable de tuer l'animal en deux à trois jours par septicémie.

Protopopoff a exalté la virulence du bacille par les passages en série chez le lapin : au bout de plusieurs passages, la virulence se fixe et le bacille inoculé sous la peau tue invariablement le lapin en cinq à huit jours.

Léo est arrivé à rendre la souris blanche réceptive au Bacille morveux en associant à l'inoculation une intoxication par la phloridzine ; il alimente des souris exclusivement avec des biscuits imbibés d'une solution alcoolique de phloridzine, puis desséchés ; l'animal ainsi alimenté devient diabétique et succombe aisément à l'inoculation du Bacille de la morve.

§ 2. — TOXINE.

Les cultures de Bacille morveux virulent stérilisées à 100° jouissent de propriétés toxiques et sont capables d'entraîner la mort rapide des animaux auxquels on les inocule. La toxine morveuse n'a pas été isolée ; elle a été étudiée d'abord par Kalning et Helman, puis par Protopopoff, Roux et Nocard. On désigne sous le nom de *malléine* un extrait des cultures en bouillon glycériné.

Préparation de la malléine (Nocard). — On ensemence dans du bouillon glycériné un virus exalté et fixé par plusieurs passages sur le lapin. La culture est laissée pendant un mois à l'étuve à 37°, puis elle est stérilisée par un chauffage de trente minutes à 100°. On évapore le liquide au bain-marie au dixième de son volume primitif, on le filtre sur papier Chardin. Le filtrat brun, sirupeux, constitue la *malléine brute*.

A la dose d'un centimètre cube, cette malléine brute doit tuer le lapin. La malléine brute traitée par plusieurs volumes d'alcool abandonne un précipité constitué par le principe actif mélangé à différentes matières étrangères.

Diagnostic de la morve par la malléine (Nocard). — Nocard a mis en lumière une propriété remarquable de la malléine : injectée à très faible dose, elle est sans action sur les animaux sains, tandis qu'elle détermine chez les animaux morveux une réaction intense, analogue à celle que produit la tuberculine chez les tuberculeux. Quand on inocule sous la peau d'un cheval sain un quart de centimètre cube de malléine, celui-ci ne présente aucun phénomène particulier ; au contraire, chez un cheval morveux, semblable injection entraîne une réaction violente caractérisée par de l'œdème au point d'inoculation, des frissons et une élévation de la température qui débute quelques heures après l'injection, peut atteindre 3° et 4° au bout de vingt-quatre heures et persiste plusieurs jours. Toutes les fois qu'un animal réagit ainsi à la malléine, il est certain que cet animal est atteint de morve.

On conçoit combien ce procédé est précieux pour le diagnostic de la morve latente, alors qu'il n'existe ni chancres, ni jetage. Il n'es pas applicable à l'homme, à cause même de l'intensité de la réaction.

Mais, dans quelques cas, en particulier quand l'animal a des lésions très avancées, la réaction peut ne pas se produire ; de même, quand l'animal malade présente une température élevée, égale ou supérieure à 39°, l'épreuve reste sans résultats.

Quand l'injection amène une réaction très légère avec une élévation de température de 1° à 1°,5, l'épreuve reste douteuse ; il est bon de laisser l'animal au repos et de recommencer l'inoculation au bout de trois à quatre semaines.

C'est en raison de ces faits qu'il est nécessaire, lorsque cela est possible, de combiner toujours à l'épreuve par la malléine, l'ensemencement sur pomme de terre et l'inoculation dans le péritoine du cobaye des produits suspects : de ces trois ordres de recherches, on pourra toujours tirer les éléments d'un diagnostic certain.

Technique. — Dans la pratique vétérinaire, on substitue à la malléine brute, une malléine diluée plus facile à manier.

On prépare la solution suivante :

Eau phéniquée à 5 p. 100..................	9 parties.
Malléine brute..............................	1 partie.

Le cheval suspect est mis en observation pendant quarante-huit heures ; on prend la température matin et soir (exclure les animaux

fébricitants) ; le troisième jour, on injecte sous la peau de l'encolure $2^{cmc},5$ de malléine diluée et, à partir de ce moment, on prend la température deux à trois fois par jour ; l'élévation de température apparaît chez les animaux morveux dès la huitième ou dixième heure après l'injection.

§ 3. — VACCINATION. — SÉROTHÉRAPIE.

I. — Straus a montré que l'on peut conférer la morve au chien en lui injectant dans les veines des cultures virulentes (Voy. p. 483); or, il a constaté que l'inoculation préalable de cultures vieillies préserve le chien contre l'infection morveuse généralisée consécutive à l'injection intraveineuse. Mais, chez les chiens ainsi immunisés, on peut encore produire des chancres morveux par inoculation cutanée. D'ailleurs, le chien inoculé à différentes reprises peut présenter jusqu'à cinq fois des chancres morveux (Galtier).

II. — Par la même méthode des inoculations préalables de cultures âgées, Sakaroff et Finger ont retardé un peu la marche de la morve expérimentale chez le lapin, mais ils n'ont jamais pu empêcher la mort de l'animal. Les inoculations de cultures chauffées à 100° n'ont pas donné de meilleurs résultats entre les mains des mêmes auteurs.

III. — Sakaroff atténue la virulence du bacille par des passages par le chat ; en injectant le bacille ainsi modifié à des chevaux, il aurait réussi à leur conférer l'immunité, mais il n'a pas inoculé de témoins, ce qui enlève toute valeur à ses expériences.

IV. — En injectant au cobaye du sérum de bovidés (naturellement réfractaires), Chenot et Picq auraient obtenu des effets préventifs et même thérapeutiques ; ce que l'on sait des propriétés du sérum des animaux réfractaires ne s'accorde guère avec ces résultats ; aussi ces expériences méritent-elles confirmation.

V. — D'après Babès, les injections de malléine permettraient de conférer une certaine immunité au cobaye, mais Nocard a démontré que la malléine ne possède aucune propriété immunisante.

Agglutination. — Le sérum des chevaux sains agglutine le bacille des cultures fraîches à des dilutions de 1 p. 100 à 1 p. 300. Au contraire, le sérum des animaux morveux agglutine dans les mêmes conditions aux dilutions de 1 p. 500 et de 1 p. 1 000 (Bourges et Méry).

CHAPITRE XXVI

LE BACILLE DE LA SÉBORRHÉE GRASSE

Des recherches de Sabouraud il résulte que la *séborrhée grasse* de l'homme et la *pelade commune* relèvent d'un même parasite. La pelade serait intimement liée à la séborrhée grasse : « La pelade aiguë est une séborrhée aiguë locale ; la pelade décalvante, une séborrhée chronique généralisée. »

C'est un fait indiscutable que le bacille décrit par Sabouraud se retrouve constamment dans la séborrhée grasse ; pour ce qui est de la pelade, il paraît nécessaire de faire des réserves et de ne pas généraliser prématurément le rôle étiologique du Bacille de Sabouraud ; en dehors des cas où, dans la pelade en aires, on rencontre le coccus de Vaillard et Vincent (Voy. p. 496), nous avons, et encore récemment, observé plusieurs cas de pelade en extension où nous n'avons pu voir ni cultiver aucun parasite spécifique. Il y a lieu d'admettre pour le moment que l'étiologie des pelades n'est pas univoque et que plusieurs causes sont capables de déterminer des lésions analogues.

Article I. — RECHERCHE ET MORPHOLOGIE DU BACILLE DE LA SÉBORRHÉE GRASSE.

§ 1er. — CARACTÈRES MICROSCOPIQUES.

Pour rechercher le Bacille de Sabouraud, on exprime une peau séborrhéique, puis on racle cette peau avec la tranche d'une lame porte-objet ; on prépare des frottis avec l'exsudation huileuse ainsi obtenue.

Les frottis sont lavés par deux fois à l'éther pour enlever les matières grasses, puis on les colore par la méthode de Gram ou plus simplement par le bleu, la fuchsine ou le violet phéniqués. Les préparations obtenues montrent, en quantité considérable et à l'état pur, un très fin bacille (fig. 216 et 217).

Ce bacille est, dans ses formes jeunes, punctiforme et analogue à un coccus ; les formes adultes sont plus manifestement bacillaires et mesurent environ 1 μ de longueur sur 1/2 μ de largeur ; on ren-

contre parfois de courtes chaînettes pouvant atteindre la longueur du Bacille tuberculeux.

Coloration. — Le Bacille de Sabouraud se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline ; les solutions mordancées ordinairement employées sont applicables à sa coloration. Il prend le Gram.

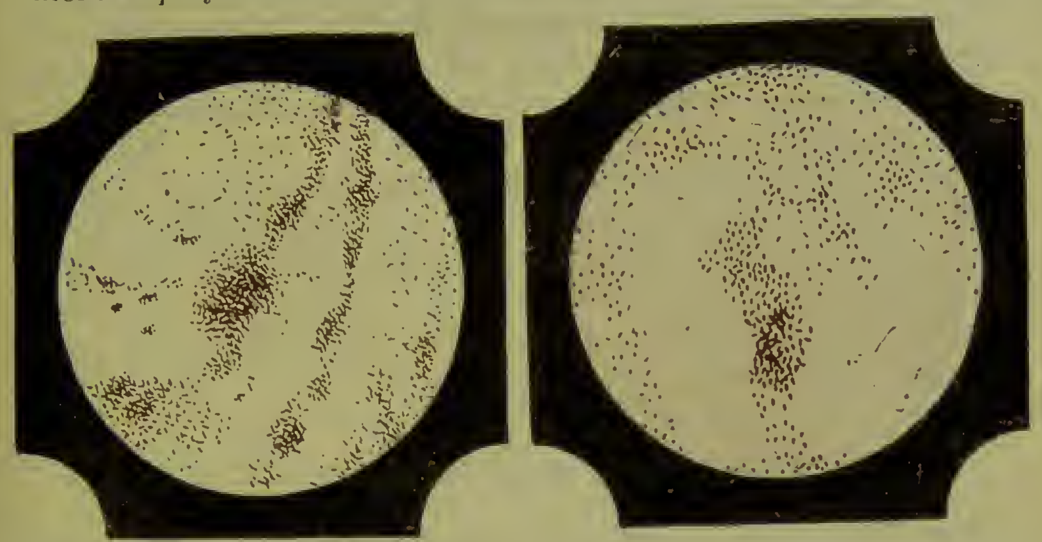


Fig. 216. — Bacille de la séborrhée grasse. — Exsudat séborrhéique. — Thionine phéniquée (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Fig. 217. — Bacille de la séborrhée grasse (autre aspect). — Exsudat séborrhéique. — Thionine phéniquée (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Anatomie pathologique. — Les colonies microbiennes siègent dans le tiers supérieur du follicule pileux, entre la surface cutanée et l'abouchement de la glande dans le follicule ; en ce point, le follicule présente une dilatation ampullaire et le poil est repoussé excentriquement par un cocon de lamelles cornées et de sebum ; c'est dans ce cocon qu'est enkystée la colonie bacillaire rigoureusement pure ; cette disposition se voit très bien dans les coupes verticales. Les bacilles y sont souvent sigmoïdes ou incurvés et groupés « en petites chaînettes ou en petits fagots, suivant la disposition si commune au bacille de Koch ».

Le développement du cocon séborrhéique dans l'orifice d'un follicule pileux amène la mort du cheveu, la dépilation en est la conséquence : de la séborrhée grasse du cuir chevelu dépend la calvitie séborrhéique ; les poils atteints se régénèrent et meurent successivement plusieurs fois, mais bientôt le poil finit par ne plus être représenté que par un follet microscopique. Pour ce qui est du mécanisme du phénomène, Sabouraud dit que « l'hypothèse d'un poison microbien soluble agissant sur la papille pilaire est plausible, mais plus facile à énoncer qu'à démontrer ».

Infections secondaires. — La séborrhée grasse peut garder indéfiniment son aspect caractéristique ou se compliquer d'infections

secondaires. La formation des *comédons* volumineux, caractérisant l'acné, est due à une infection secondaire : « le comédon n'est qu'un cocon séborrhéique monstrueux et dégénéré ». Au centre du comédon on retrouve toujours la colonie bacillaire, mais ses couches superficielles sont envahies par divers microbes; de la diversité de ces espèces associées dépend le polymorphisme de l'acné. On y trouve constamment le Bacille bouteille de Unna qui paraît n'avoir aucune valeur pathogène et un *coccus blanc* qui semble causer l'acné indurée et l'acné suppurée.

Dans certains kystes dont le contenu répand une forte odeur butyrique, Sabouraud a rencontré deux bacilles incomplètement déterminés, le coccus blanc signalé plus haut et des spirilles non cultivables.

Dans l'acné furonculeuse, l'infection secondaire est produite par le Staphylocoque doré.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture et ensemencement. — Il est très malaisé d'obtenir des cultures en partant du comédon ou de la séborrhée du cuir chevelu. Le Bacille de Sabouraud exige, comme toutes les bactéries de la peau, un milieu de culture acide ; sur le milieu suivant, sa culture est «presque facile».

Peptone	20 grammes.
Glycérine	20 —
Acide acétique cristallisable	5 gouttes.
Eau	1 000 grammes.
Gélose	13 —

Cette gélose est répartie dans des tubes et solidifiée inclinée.

Pour pratiquer l'ensemencement, on lave la peau séborrhéique à l'éther, puis on la racle énergiquement avec le tranchant d'une lame de verre flambée. Le sebum obtenu est ensemencé par frottis sur la surface des tubes; on doit ensemencer sur chaque tube une certaine quantité de sebum. Sur trois ou quatre tubes on obtient d'emblée, au milieu de colonies étrangères, une ou deux colonies pures.

Caractères des cultures. — A 35°, ces colonies deviennent visibles au quatrième jour et prennent une forme conique acuminée caractéristique, en même temps qu'elles se colorent en rouge-brique (uniquement sur les milieux glycérinés). Toujours on retrouve comme impuretés de très nombreuses colonies du coccus blanc signalé plus haut.

Isolement. — La séparation du coccus blanc et du bacille pré-

sente parfois de grandes difficultés; Sabouraud conseille les procédés suivants :

1° Laisser vieillir pendant deux mois entre deux lames stériles le sebum d'ensemencement : le coccus blanc meurt avant le bacille et on obtient alors assez facilement une culture pure du bacille.

On peut encore laisser vieillir une culture contenant les deux organismes; après un mois, le bacille reste seul vivant; le réensemencement doit être pratiqué avec une parcelle notable de la culture mère.

2° Sabouraud a imaginé un procédé ingénieux qui donne rapidement des cultures pures, celui de la *gélose vaccinée*. C'est une application de ce principe que certains microbes vaccinent le milieu où on les cultive et le rendent impropre à une culture ultérieure de la même espèce.

Un bouillon préparé comme il est dit plus haut, mais sans gélose, est ensemencé avec le coccus blanc; au bout de douze jours, on l'additionne de gélose et on en prépare des tubes stérilisés.

En ensemençant le sebum sur cette gélose vaccinée, on n'obtient, pour ainsi dire, plus de coccus blanc, tandis que les colonies du bacille spécifique se développent abondamment. Malheureusement, si le coccus ne pousse pas, il n'est pas tué et peut réapparaître dans les cultures filles. Aussi Sabouraud préfère-t-il la méthode suivante :

3° Le sebum est soumis pendant dix heures à une température de 65°-67°; le coccus blanc est tué, le bacille résiste et on obtient par l'ensemencement une culture pure d'emblée.

§ 3. — INOCULATIONS.

Les inoculations aux animaux n'ont fourni, jusqu'à présent, aucun résultat; la peau des animaux ne se prête pas à l'expérimentation, elle ne ressemble que de très loin à la peau humaine et la flore microbienne cutanée du cobaye et du lapin est très différente de celle de l'homme.

Article II. — RECHERCHE DU BACILLE DE SABOURAUD DANS LA PELADE.

Pour Sabouraud, une plaque peladique est une manifestation aiguë de la séborrhée grasse. Si, au début d'une plaque peladique, on prélève un morceau de la peau atteinte et que l'on y pratique des coupes verticales, on voit que tous les follicules pileux sont infectés par le Bacille de la séborrhée, tandis qu'autour de la surface malade, le cuir chevelu est sain et les follicules non infectés.

Plus tard, dès que le poil est tombé, la papille pilaire, avant de mourir, sécrète un bouchon informe de cellules et de pigment qui vient soulever d'une pièce et expulser du follicule le cocon microbien qui l'occupait : dès ce moment, le bacille ne se retrouve plus dans les coupes de la peau.

Pour constater la présence du bacille dans les follicules, Sabouraud recommande le procédé suivant :

Épiler la bordure d'une petite plaque malade et une assez large région autour d'elle, puis frictionner toute cette surface une ou deux fois avec de l'acide acétique pur. Une croûte se forme et, quand elle se détache de la peau, elle enlève avec elle tous les cocons séborrhéiques de la région. Les coupes verticales pratiquées dans cette croûte permettent de voir que les cocons renferment le bacille de Sabouraud à l'état pur ; on peut obtenir des cultures en ensemençant ces cocons.

LE COCCUS DE LA PSEUDO-PELADE.

Vaillard et Vincent ont décrit sous le nom de « pseudo-pelade » une affection alopécique du cuir chevelu, disséminée ou en aires, contagieuse et due à l'invasion des follicules par un coccus.

CARACTÈRES MICROSCOPIQUES.

Examen des cheveux. — Des cheveux fragiles sont arrachés au pourtour de la région alopéciée et colorés par le violet phéniqué ou mieux par la méthode de Gram. On voit à la périphérie des poils, jamais dans leur épaisseur, et sur les lambeaux de la gaine épithéliale des follicules, de petits coccus groupés par deux ou en amas cohérents, parfois si abondants qu'ils semblent constituer une gaine à la surface des cheveux malades. Si l'examen des cheveux reste négatif, on n'est pas autorisé à conclure à l'absence certaine du parasite et il faut avoir recours aux cultures.



Fig. 218. — Cheveu peladique ; Coccus de Vaillard et Vincent. — Méthode de Gram (Reich. ; Obj. 9 ; Oc. II).

Examen de la peau. — On pratique des coupes sur un fragment de peau excisé au niveau d'une plaque alopécique, fixé à l'alcool et inclus dans la paraffine. Sur ces coupes colorées par la méthode de Gram on voit les follicules vides de leur poil et parfois dilatés et encombrés par des lames écailleuses d'aspect corné ; dans tous ces follicules on trouve des amas de

petits coccus colorés en violet. Le parasite ne franchit pas la gaine épithéliale externe. Parfois les follicules peladiques sont envahis par les microbes de la suppuration ; ceux-ci dissocient la gaine épithéliale externe et peuvent pénétrer dans le tissu conjonctif avoisinant les follicules ; la peau de la plaque alopécique est alors enflammée, rouge et couverte de petites pustules.

CULTURES.

On peut obtenir des cultures de deux façons différentes :

1° La partie profonde d'un fragment de peau alopécique prélevé purement est grattée avec un bistouri flambé ; le produit du raclage est ensemencé sur des tubes de gélose. Ce procédé n'est pas applicable à la pratique journalière.

2° Le procédé de choix, utilisable pour le diagnostic, est le suivant : la plaque alopécique est lavée à l'alcoolé de savon, rincée à l'éther, frottée avec un tampon imbibé de sublimé acide à 1 p. 1000, rincée à l'alcool absolu, puis essuyée avec du papier filtre stérilisé; on pratique alors à sa surface quelques scarifications superficielles avec un bistouri flambé, on recueille avec une öse les gouttelettes de sang qui suintent et on les ensemence à la surface de trois tubes de gélose que l'on porte à l'étuve à 37°. Dans ces tubes le sang des plaques peladiques donne, au bout de vingt-quatre heures, des colonies circulaires, blanches, saillantes, lisses, régulières, opaques et atteignant au bout de quelques jours la taille d'une lentille. Elles sont constituées par un petit coccus d'environ 1 μ de diamètre, fréquemment groupé en diplocoques, se colorant bien par les couleurs basiques d'aniline et prenant le Gram. — Les colonies du Coccus de la pelade sont parfois mélangées à de rares colonies de Streptocoque ou de Staphylocoque.

Le Coccus de la pseudo-pelade est aérobie facultatif, mais en l'absence de l'air il ne donne que des cultures très grêles. Il se développe sur les milieux usuels. En bouillon il produit un trouble, puis un précipité blanc. La strie sur gélose forme une traînée blanche. Il liquéfie la gélatine, d'abord en entonnoir, puis sur toute la hauteur du tube. Sur pomme de terre la culture est minime, d'un blanc grisâtre.

INOCULATIONS.

Inoculation sous-cutanée. — Chez la souris, la mort par septicémie, sans lésions apparentes, arrive quarante-huit heures après l'inoculation sous-cutanée de culture récente en bouillon; le sang et les viscères contiennent le coccus en abondance. — Le lapin et le cobaye sont réfractaires.

Inoculation cutanée. — Une friction modérée, pratiquée avec un tampon imbibé de culture, sur une région quelconque de la peau du cobaye et du lapin, après que les poils ont été coupés, détermine la formation d'une plaque d'alopécie analogue à celle de la pelade humaine : le deuxième jour, la région inoculée rougit; à partir du huitième jour, les poils deviennent fragiles et finissent par tomber spontanément; au bout de six semaines environ, les poils repoussent avec leur aspect normal et il ne reste plus trace de l'affection. Quand on a obtenu ainsi une plaque alopécique sur la face externe de l'oreille du lapin, on constate que la région homologue de l'oreille opposée présente à son tour une plaque semblable : c'est là une transmission par simple contact, l'animal au repos abaissant et accolant ses oreilles sur la région cervico-dorsale.

CHAPITRE XXVII

LE SPIRILLE DE LA FIÈVRE RÉCURRENTE

L'agent du typhus récurrent est un spirille découvert par Obermeier en 1868; c'est le premier microbe qui ait été rencontré dans une maladie purement humaine.

La fièvre récurrente ne sévit spontanément que sur l'homme. Le spirille se rencontre dans le sang pendant l'accès fébrile, on ne l'y trouve que très rarement et en très petite quantité pendant l'apyrexie; au moment de l'élévation précritique de la température, les spirilles disparaissent d'ordinaire du sang et on ne les retrouve plus que dans la rate où ils sont englobés par les leucocytes polynucléaires. La maladie se transmet facilement par le sang humain; après absorption de sang typhique, les spirilles restent vivants plus d'un mois dans l'intestin de la sangsue. La transmission semble se faire d'ordinaire par la punaise; c'est une maladie des populations malpropres et des asiles de nuit.

Article I. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

Carter et Koch ont montré que les singes de l'ancien continent peuvent contracter la fièvre récurrente par inoculation sous-cutanée de sang prélevé chez l'homme malade; chez le singe, la rechute caractéristique de la maladie humaine ne se produit pas d'ordinaire.

Metchnikoff, Soudakewitch, ont étudié chez le singe les phénomènes consécutifs à l'inoculation des spirilles.

Pendant l'accès, les spirilles abondent dans le sang; ils sont toujours extracellulaires, jamais on ne les trouve englobés par les globules. Mais, dès l'élévation précritique les spirilles disparaissent du sang; par contre, ils fourmillent dans la rate. Dans la rate, après l'accès, les spirilles ont un siège intracellulaire et sont inclus dans les leucocytes polynucléaires : on trouve des amas irréguliers de ces leucocytes renfermant des spirilles et formant de petits abcès microscopiques. Ces amas leucocytaires peuvent devenir assez considérables pour constituer de véritables lymphomes inflammatoires (Ponfick, Soudakewitch).

Dans un même leucocyte, on peut rencontrer plusieurs spirilles; on note parfois autour des leucocytes des accumulations de spirilles disposés comme les rayons d'une roue; bientôt, à l'intérieur des cellules, les spirilles disparaissent, on ne trouve plus que des granulations irrégulièrement disposées

et enfin la cellule reprend son aspect normal. Certains phagocytes, au contraire, montrent un noyau nécrotique, ne fixant plus les colorants; ici la cellule animale a succombé à la lutte contre le parasite. Les spirilles sont englobés vivants par les leucocytes : un peu de la rate d'un animal sacrifié en période apyrétique (alors que tous les spirilles sont englobés) inoculé à un singe neuf lui confère la maladie; certains spirilles conservent donc leur virulence un certain temps après l'englobement, ce sont eux qui déterminent, par un phénomène assez obscur, le second accès chez l'homme (Metchnikoff, Bardach).

Soudakewitch a mis en évidence, d'une façon irréfutable, le rôle de la rate dans la fièvre récurrente. Il pratique chez des singes l'ablation de la rate, puis leur inocule la fièvre récurrente; les animaux ainsi traités succombent fatalement à la maladie : le nombre des spirilles augmente d'instant en instant dans le sang et arrive à dépasser celui des globules, la phagocytose ne se produit pas et la mort arrive.

Article II. — RECHERCHE ET MORPHOLOGIE DU SPIRILLE.

On recherche les spirilles dans le sang obtenu par piqûre du doigt, selon le procédé ordinaire (p. 192). On examine immédiatement une gouttelette de sang à l'état frais, et on prépare avec d'autres gouttes des lamelles sèches pour la coloration.

État frais. — Dans le sang frais recueilli pendant l'accès, on voit entre les globules de nombreux spirilles longs de 15 à 40 µ, très minces, effilés aux extrémités et présentant chacun huit à dix spires; ils sont très mobiles, se déplacent dans la préparation en écartant les globules, soit en ligne droite par un mouvement oscillatoire, soit par un mouvement de vrille. Ces mouvements sont dus à l'action de quatre cils, disposés par bouquets de deux à chaque extrémité du spirille et difficilement colorables par le violet d'Ehrlich.

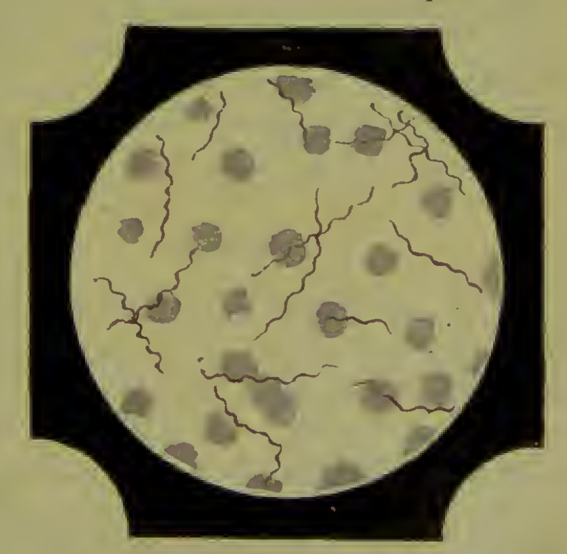


Fig. 219. — Spirille de la fièvre récurrente (sang). — Procédé de Günther (Reich., Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Les spirilles ne forment jamais de spores; ils se reproduisent par division transversale (Metchnikoff, Bardach).

Coloration. — Le Spirochète d'Obermeier se colore assez difficilement et exige l'emploi de méthodes spéciales.

1° **Lamelles.** — Les lamelles de sang destinées à subir la coloration

sont préparées par le procédé ordinaire, mais doivent être désséchées à l'air où à l'étuve à 60°-70° sans jamais subir l'action directe de la flamme. Pour bien voir le parasite, on doit commencer par débarrasser les globules rouges de leur hémoglobine. Le procédé de choix est dû à Günther.

Procédé de Günther. — Suivre la technique exposée page 215, employer comme colorant le violet aniliné d'Ehrlich et le laisser agir huit à dix minutes.

Les globules rouges sont incolores; seuls, les spirilles et les globules blancs sont teints en violet (fig. 219).

Non seulement la coloration permet de voir plus nettement les spirilles, mais, dans les préparations colorées, on aperçoit des spirilles beaucoup plus nombreux que dans les préparations de sang frais.

2° **Coupes.** — On peut colorer les spirilles dans des coupes de fragments de rate fixés dans l'alcool absolu et inclus dans la paraffine. On colore les coupes par le procédé de Nikiforoff.

Procédé de coloration de Nikiforoff. — 1° Colorer les coupes par un séjour de vingt-quatre à quarante-huit heures à la température ordinaire dans la solution suivante :

Solution aqueuse saturée de bleu de méthylène...........	10 volumes.
Eau distillée...	10 —
Solution alcoolique de tropéoline à 1 p. 100.............	1 volume.

2° Au sortir de la solution colorante, laver les coupes à l'eau distillée, puis à l'alcool-éther.

3° Éclaircir à l'essence de girofle, au xylol, monter dans le baume.

Cultures. — Tous les essais de culture ont échoué.

Article III. — SÉROTHÉRAPIE.

Gabritchewsky a cru constater que le sang du singe, après la cessation de l'accès, était bactéricide *in vitro*; il mêle à une goutte de sang, prélevé chez un malade pendant l'accès et contenant de nombreux spirilles, une goutte de sérum provenant d'un singe en apyrexie : au bout d'une à quatre heures, les spirilles deviennent immobiles, renflés, « en un mot, complètement modifiés » ; au contraire, le mélange de sérum normal laisserait les spirilles vivants pendant quatre-vingts à cent soixante heures. Metchnikoff, Soudakewitch, ont montré que les formes modifiées de Gabritchewsky n'étaient que des accidents de préparation.

1. — Comme le remarque Metchnikoff, la propriété bactéricide du sang, dans les recherches mêmes de Gabritchewsky, s'est montrée très variable, et,

à côté des chiffres de une, deux, quatre heures, on trouve, avec le même sang, ceux de cent dix-sept et cent dix-huit heures.

II. — Metchnikoff a vu les spirilles garder leur mobilité pendant sept heures après mélange à une forte quantité de sang retiré d'un malade après la crise. Les formes anormales ne se manifestent pas si la préparation est faite avec soin ; au contraire, il suffit de chauffer trop fortement la préparation sur un point pour les faire apparaître.

III. — Ivanoff, Bardach montrent que le pouvoir bactéricide est dû en grande partie à l'action du *mélange* des sérums. Ils prouvent que l'apparition de cette propriété n'est pas en rapport avec la crise et que l'on ne peut s'associer à l'hypothèse formulée par Gabritchewsky que les spirilles sont détruits dans le plasma sanguin au moment de la crise, hypothèse qui n'est basée sur aucune observation directe ; pas davantage, on ne peut considérer comme démontrée cette conclusion que l'état réfractaire est lié à l'existence du pouvoir bactéricide du sang.

Gabritchewsky a obtenu chez un singe une défervescence rapide, en quarante-huit heures (un animal témoin fut malade soixante-douze heures et eut un deuxième accès), par l'injection du sérum d'un autre singe ayant fait sa défervescence.

Bardach injecte à un singe infecté, ayant une température de 39° et des spirilles dans le sang, 6 centimètres cubes de sang d'un autre animal ayant fait sa défervescence depuis quatre heures. Chez le singe ainsi traité, la température était tombée à la normale et le sang ne contenait plus de spirilles, le lendemain ; la température resta normale pendant sept jours, puis la fièvre réapparut pendant trente-six heures en même temps que les spirilles se retrouvaient dans le sang. On peut supposer que l'injection sérothérapique a entraîné l'englobement des spirilles par les phagocytes, mais non leur destruction ; les spirilles remis en liberté auraient occasionné la rechute.

LE SPIRILLE DE LA SEPTICÉMIE DES OIES.

Sakharoff a observé à Tiflis une maladie des oies causée par un spirille analogue à celui de la fièvre récurrente et qu'il a dénommé *Spirochœte anserina*.

Le Spirille des oies présente le même aspect que le Spirille humain, il est cependant un peu plus court (10 à 12 μ), plus épais et moins onduleux. Il ne cultive pas dans les milieux ordinaires.

Les oies malades présentent pendant plusieurs jours des spirilles dans le sang, puis ceux-ci disparaissent brusquement et les animaux succombent avec une dégénérescence graisseuse de leurs viscères : l'oie meurt d'intoxication après avoir triomphé de l'infection.

Cantacuzène a donné une étude approfondie de l'infection expérimentale.

L'oie, le canard sont très sensibles à la septicémie, la poule adulte l'est peu ; les poussins, le moineau, le pigeon sont très réceptifs ; les rongeurs sont réfractaires.

Pour la recherche des spirilles dans les coupes, Cantacuzène recommande le procédé suivant :

1° Fixer par la liqueur de Flemming, pendant vingt-quatre heures, les organes coupés en très petits fragments. Laver à l'eau pendant vingt-quatre heures.

2° Inclure à la paraffine dissoute dans le xylol.

3° Faire des coupes très minces, les coller sur lames, colorer par un séjour de vingt-quatre heures dans le liquide suivant :

Liquide de Ziehl	2 parties.
Glycérine neutre	1 partie.

4° Laver rapidement les coupes dans l'eau ; enlever l'excès d'eau au papier buvard ; déshydrater par plusieurs bains d'éther anhydre pendant quatre à six heures ; monter dans le baume dissous dans l'éther.

Chez les animaux sensibles, après l'inoculation, les spirilles pullulent dans le sang, puis en disparaissent dès que la défervescence s'est produite. Jamais, *in vivo*, les spirilles ne périssent dans le sang ; ils n'y subissent aucun phénomène bactériolytique et n'y sont pas englobés par les phagocytes. Au moment de la défervescence, les spirilles sont englobés dans la rate par les *phagocytes mononucléaires* ; les spirilles englobés perdent leur colorabilité, s'entourent parfois d'une vacuole et se dissolvent en bloc sans se résoudre en granulations. Jamais les leucocytes polynucléaires n'interviennent dans la destruction des spirilles. L'animal meurt après l'englobement des parasites ; les éléments de défense n'ont pu détruire la toxine.

CHAPITRE XXVIII

LE VIBRION DU CHOLÉRA

Le choléra asiatique est produit par le *Vibrion* ou *Bacille virgule* découvert par Koch.

Le Vibrion du choléra est essentiellement polymorphe; il en existe un grand nombre de variétés s'écartant plus ou mois du type décrit par Koch. Si l'on ajoute que, dans les eaux, les fèces des sujets sains, etc., on trouve fréquemment des vibrions morphologiquement analogues sinon identiques à celui du choléra, on comprendra combien, en dehors des grandes épidémies, le diagnostic du Vibrion de Koch est difficile et aléatoire.

Le Vibrion de Koch se rencontre dans le contenu intestinal et les déjections des cholériques; on le trouve rarement dans les matières vomies. Le Vibrion reste localisé dans l'intestin et y sécrète une toxine qui cause les symptômes du choléra.

Article I. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

§ 1er. — PÉRITONITE CHOLÉRIQUE.

L'inoculation d'une culture du Vibrion de Koch dans le péritoine du cobaye est susceptible de conférer à cet animal une péritonite vibrionienne (Pfeiffer) rapidement mortelle, mais qui n'a aucun rapport avec le choléra intestinal de l'homme.

La virulence des vibrions est excessivement variable. Certains vibrions ne provenant pas de cas de choléra humain produisent la péritonite chez le cobaye, tandis que des vibrions récemment isolés de l'intestin de cholériques peuvent se montrer absolument inactifs vis-à-vis de cet animal. L'aptitude à produire la péritonite vibrionienne ne saurait donc en aucun cas être considérée comme une propriété caractéristique du Vibrion de Koch.

Pour produire la péritonite cholérique, on devra s'adresser à une culture sur gélose; la totalité ou une portion de cette culture (suivant la virulence) est délayée dans un centimètre cube de bouillon stérile et injectée dans la péritoine. Peu d'heures après l'inocula-

tion se manifestent les symptômes morbides : l'animal devient somnolent, la température centrale s'abaisse rapidement, le collapsus s'établit, des convulsions surviennent et la mort termine la scène. A l'autopsie, la cavité péritonéale contient un exsudat abondant renfermant une quantité variable, mais d'ordinaire peu considérable de vibrions ; l'intestin distendu présente la teinte hortensia, son contenu renferme des Bacilles virgules en petit nombre ; on ne constate pas de lésions des viscères ; les vibrions peuvent se généraliser dans le sang dont l'ensemencement donne alors une culture pure de ces microbes. Les passages successifs par le péritoine des cobayes augmentent la virulence du Vibrion; cette virulence semble fixée vers le vingtième passage (Haffkine).

§ 2. — INOCULATION SOUS-CUTANÉE.

L'infection du cobaye et du lapin par la voie sous-cutanée n'est possible qu'avec des vibrions très virulents ; elle a été réalisée avec les Vibrions de Massaouah, d'Angers, etc. L'animal succombe plus ou moins rapidement à la septicémie vibrionienne, après avoir présenté une hypothermie progressive accompagnée de convulsions et de collapsus. Le sang, la pulpe des viscères fournissent des cultures pures du Vibrion.

Le spermophile est beaucoup plus sensible que le cobaye à l'inoculation du Vibrion du choléra.

§ 3. — INOCULATION INTRAMUSCULAIRE.

Le cobaye est en général plus sensible à l'inoculation intramusculaire qu'à l'inoculation sous-cutanée.

On a donné longtemps comme un caractère distinctif du Vibrion du choléra qu'il n'était pas pathogène pour le pigeon ; Gamaléia, Metchnikoff, ont montré que beaucoup de Vibrions cholériques légitimes étaient pathogènes pour cet animal ; l'inoculation du Vibrion d'Angers, par exemple, dans le muscle pectoral du pigeon, tue rapidement cet oiseau par septicémie.

§ 4. — CHOLÉRA INTESTINAL.

Les symptômes produits par l'inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale du Vibrion n'ont rien de commun avec ceux du choléra véritable. Les essais d'inoculation par les voies digestives n'ont, pendant longtemps, fourni aucun résultat satisfaisant ; les travaux de Metchnikoff ont fait faire un grand pas à l'étude du choléra intestinal expérimental.

ANIMAUX.

I. — L'injection de cultures de Vibrion et de selles cholériques restant sans action sur les animaux, Nicati et Riestch pensèrent à pratiquer directement l'inoculation dans l'intestin et injectèrent les cultures dans le duodénum du cobaye, après laparotomie ; les premiers ils obtinrent un choléra intestinal expérimental.

II. — Koch arrive aux mêmes résultats par le procédé suivant : il place une sonde dans l'œsophage du cobaye et injecte dans l'estomac quelques centimètres cubes d'une solution de carbonate de soude à 2 p. 100 ; quelques minutes après il injecte dans l'estomac la culture de Vibrion et dans le péritoine ou sous la peau 1 à 1^{cc},5 de teinture d'opium. Les animaux tombent bientôt en somnolence, puis reviennent à l'état normal au bout d'une à deux heures ; vers la douzième heure qui suit l'inoculation le collapsus s'établit, des selles diarrhéiques se produisent, la température s'abaisse progressivement et la mort survient après un à trois jours. A l'autopsie, l'intestin grêle est distendu, congestionné ; il contient un liquide aqueux présentant des flocons crémeux et renfermant une culture à peu près pure de Vibrions ; les coupes de l'intestin montrent que les Vibrions en ont pénétré les parois.

Doyen a modifié légèrement le procédé de Koch ; il substitue à la teinture d'opium de l'alcool à 40°, à la dose de 1^{cc},6 à 1^{cc},8 par 100 grammes du poids de l'animal, et obtient les mêmes résultats qu'avec la teinture d'opium : c'est donc l'alcool qui agit dans cette teinture.

III. — Zabolotny a montré que le spermophile est très sensible à l'ingestion du Vibrion cholérique. Quand on nourrit des spermophiles avec des aliments arrosés de quelques gouttes d'une culture pure de Vibrion, la moitié des animaux ainsi traités prennent le choléra et meurent, les autres résistent. La mortalité est plus grande si on mêle un sel alcalin à la nourriture contaminée, mais quelques individus résistent cependant. Les animaux infectés présentent de la faiblesse, de l'hypothermie, fréquemment de la diarrhée, parfois des crampes, de la cyanose du nez et de la langue. A l'autopsie, le tube intestinal est distendu, hyperémié et contient un liquide riche en Vibrions ; souvent ces Vibrions envahissent le péritoine et le sang. Malheureusement on se procure difficilement le spermophile et il ne se reproduit pas en captivité ; il ne saurait donc être d'un grand secours pour l'étude du choléra expérimental.

IV. — Metchnikoff, partant de cette idée qu'une large part de l'immunité des animaux contre le choléra intestinal est due à l'in-

fluence des microbes du canal digestif, cherche à supprimer ou à diminuer cette influence. Il s'adresse au jeune lapin, qui ne se nourrit que du lait de sa mère pendant plusieurs semaines et dont la flore intestinale reste longtemps assez pauvre et peu variée. Avec l'extrémité recourbée d'une pipette, Metchnikoff racle une culture de vingt-quatre heures sur gélose [choléra de Massaouah (1)] et l'introduit dans la bouche des jeunes lapins : dans la moitié des cas, les animaux ainsi inoculés succombent au choléra intestinal ; il se produit de la diarrhée et la mort arrive vers le sixième jour ; à l'autopsie on trouve les lésions du choléra ; le contenu de l'intestin renferme de nombreux vibrions.

V. **Microbes favorisants.** — Metchnikoff a établi que, dans les cultures sur plaques de gélatine, certains microbes favorisent le développement des Vibrions du choléra tandis que d'autres microbes empêchent ce développement. Metchnikoff a reconnu des propriétés favorisantes particulièrement à trois microbes isolés de l'estomac de l'homme : une sarcine blanche, une torula et un bacille du groupe des coliformes. Le Vibrion de Massaouah ingéré en commun avec des cultures de ces microbes favorisants a provoqué un choléra mortel chez la presque totalité des jeunes lapins inoculés (vingt sur vingt-deux) ; la mort survient d'ordinaire trente-six à quarante-huit heures après l'injection, parfois seulement vers la soixantième à cent-vingtième heure, rarement après la deux-centième heure. Les animaux infectés présentent une diarrhée liquide, incolore, séreuse, avec des grumeaux de mucus ; il ne se produit pas de vomissements, mais on note fréquemment de l'anurie ; les parois abdominales sont molles et flasques, le lapin devient triste et immobile, sa température s'abaisse jusqu'à 30° et au-dessous, et la mort arrive après une agonie parfois fort longue. — A l'autopsie, on ne constate aucune lésion des viscères thoraciques ou abdominaux ; seul l'intestin grêle est hyperémié, présente une teinte hortensia et est distendu par un liquide louche, glaireux ; le cæcum renferme une grande quantité de sérosité louche contenant des flocons muqueux et présentant une réaction alcaline. Le liquide de l'intestin grêle contient une énorme quantité de vibrions, le plus souvent en culture pure. Les microbes ingérés en même temps que le Vibrion disparaissent quand ils ont accompli leur rôle favorisant. Le Vibrion passe dans le sang dans un quart des cas.

Dès que les jeunes lapins cessent de s'alimenter exclusivement de

(1) Un vibrion isolé des eaux de Versailles et virulent pour le cobaye (inoculation intra-péritonéale) s'est comporté de la même façon que le Vibrion de Massaouah vis-à-vis des jeunes lapins.

lait, leur réceptivité disparaît et il s'établit une immunité que ne peut vaincre l'association des microbes favorisants. Le choléra intestinal des jeunes lapins est contagieux et peut se transmettre par l'intermédiaire des mamelles de la mère souillées pendant la tetée par les animaux infectés.

Les jeunes cobayes âgés de quelques jours sont beaucoup moins sensibles que les lapins à l'action du Vibrion de Massaouah ingéré avec les microbes favorisants; le choléra intestinal qu'ils prennent est moins caractéristique que celui des lapins et le Vibrion a une tendance plus grande à se généraliser dans l'organisme du cobaye.

HOMME.

Depuis longtemps des expérimentateurs ont tenté de produire le choléra chez l'homme par ingestion de matières fécales cholériques (Bochefontaine, Klein). En 1892, Pettenkofer et Emmerich absorbent des cultures pures de Vibrion de Koch; malgré l'ingestion préalable de carbonate de soude et la réalisation d'écarts de régime, ils n'obtiennent qu'une diarrhée cholériforme sans accidents généraux.

Hasterlik et Stricker, Ferran, purent de même déterminer des diarrhées et des vomissements par l'ingestion de cultures pures de Vibrion.

Metchnikoff, à diverses reprises, ingéra et fit ingérer à ses élèves des cultures pures de vibrions de différentes provenances (Vibrions de Hambourg, Courbevoie, Saint-Cloud, Paris, Versailles, etc.). Le patient commençait par avaler un gramme de bicarbonate de soude dissous dans un peu d'eau et, immédiatement après, il ingérait une quantité variable de culture sur gélose émulsionnée dans un peu de bouillon stérile. Metchnikoff obtint ainsi des diarrhées riziformes caractéristiques et « un vrai choléra asiatique qui, quoique léger, présenta tous les symptômes classiques » (diarrhée riziforme, hypothermie, vomissements, crampes des mollets, anurie, vibrions en culture à peu près pure dans les selles).

Il ne semble exister aucun rapport entre la propriété d'un vibrion de développer la péritonite cholérique chez le cobaye et l'aptitude à déterminer le choléra intestinal.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

Les vibrions sont essentiellement polymorphes; il en résulte une certaine difficulté dans leur étude et leur recherche. La forme des vibrions, le nombre de leurs cils, la manière dont ils se comportent dans les différents milieux sont sujets à de nombreuses variations.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Vibrion de Koch a la forme d'un bâtonnet trapu, long de 1,5 à 3 μ, large de 0,5 à 0,6 μ, légèrement incurvé en virgule; le degré d'incurvation est très variable ; dans le champ du microscope un certain nombre de vibrions paraissent rectilignes, ce sont ceux dont le plan de courbure est perpendiculaire à la surface de la lame, l'œil n'en voit que la projection sur le plan de la lame et la courbure disparaît. Le Vibrion est très mobile et possède des cils vibratiles.

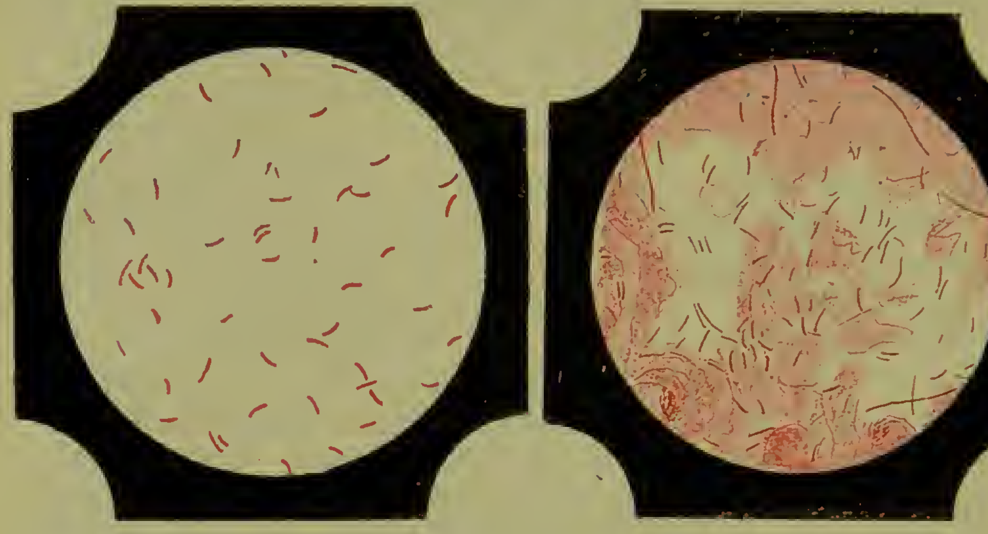


Fig. 220. — Vibrion du choléra (Vib. indien). — Culture sur gélose. Fuchsine de Ziehl diluée (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Fig. 221. — Vibrion du choléra (Massaouah). — Frottis avec le contenu intestinal. Fuchsine de Ziehl diluée (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Mais il existe d'autres variétés de vibrions s'écartant notablement du type de Koch. Les uns sont minces, irrégulièrement incurvés et présentent parfois la forme d'un S allongé (Vibrions de Massaouah, de Courbevoie, de Paris). D'autres vibrions sont rectilignes et ne présentent jamais d'incurvation (Vibrion de Shangaï) ; d'autres encore, très petits, coccobacillaires (Vibrion de Malte). Bien plus, Metchnikoff, en réensemençant une vieille culture en eau peptonisée de Vibrion d'Angers, vibrion d'ordinaire trapu et recourbé, a obtenu une forme mince et allongée.

Dans les cultures âgées de plusieurs jours on trouve des formes d'involution ; beaucoup de vibrions sont irrégulièrement renflés, à côté d'eux on voit des éléments arrondis, de volume variable.

Certains de ces corps sphériques correspondraient d'après Hueppe à des formes de résistance, ce seraient des arthrospores formées par enkystement des vibrions; ces arthrospores ne sont pas plus résistantes que le Vibrion lui-même.

Coloration. — Les vibrions se colorent plus difficilement que les bacilles ; on utilise des solutions mordancées un peu fortes : la fuchsine de Ziehl étendue de trois à quatre fois son volume d'eau convient parfaitement. Les vibrions ne prennent pas le Gram.

Cils vibratiles. — Le nombre et la disposition des cils vibratiles sont très variables. Le Vibrion type de Koch ne possède qu'un cil placé à une extrémité ; Nicolle et Morax ont montré que certaines variétés présentaient deux, trois ou même quatre cils placés plus ou moins régulièrement aux extrémités ; une variété indienne étudiée par ces auteurs est immobile et ne présente pas de cils.

On peut colorer les cils, à l'état vivant par le procédé de Straus, ou, après dessiccation, par les procédés décrits pages 150 et suivantes, en utilisant toujours de jeunes cultures sur gélose.

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Vibrion du choléra est essentiellement aérobie ; il donnerait cependant une culture très grêle dans les milieux privés d'air (Hueppe et Scholl). Il se développe de + 12° à 40°, sa température optima de culture est 37°. Il cultive dans tous les milieux usuels, neutres ou légèrement alcalins.

Bouillon. — Eau peptonisée. — A 37°, trouble rapide (dixième à douzième heure), puis formation à la surface d'un voile mince blanchâtre, très fragile ; par la suite, il se produit un précipité floconneux.

Gélatine. — *Piqûre.* — A 20° apparaissent dès la vingtième heure de petites colonies le long de la piqûre. Rapidement il se produit à la surface une petite cupule dans laquelle est retenue une bulle d'air. A partir de ce moment la liquéfaction s'accentue, elle progresse en entonnoir et est plus marquée à la surface qu'au fond du tube ; la bulle d'air continue à exister à la surface (deuxième à quatrième jour, culture caractéristique). Peu à peu la liquéfaction envahit tout le tube et la culture cesse d'être caractéristique.

Fig. 222. — Choléra ; Vibrion indien. — Piqûre en gélatine, quatrième jour.

Colonies isolées. — A 20°, vers la vingtième heure, apparaissent de petits points blanchâtres qui ne tardent pas à former des colonies irrégulières, granuleuses, à bords un peu sinueux, puis la liquéfaction commence, elle se produit en cupule ; au centre de la zone liquéfiée apparaît la colonie, de la périphérie de laquelle se détachent de

petits groupes de vibrions. Bientôt la plaque se liquéfie en totalité.

Gélose. — A 37°, strie abondante, blanchâtre, se développant rapidement et ne présentant pas de caractères spéciaux.

Sérum coagulé. — Développement rapide avec liquéfaction.

Pomme de terre. — Les vibrions ne se développent bien que sur la pomme de terre alcalinisée (Voy. p. 57), ils forment alors une strie épaisse, brun clair. Sur la pomme de terre légèrement acide le développement est nul ou très grêle.

Lait. — Les vibrions cultivent d'ordinaire dans le lait sans le coaguler.

Article III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Le Vibrion du choléra garde assez longtemps sa vitalité dans les cultures conservées à l'obscurité et à l'abri de la dessiccation ; dans ces conditions, les cultures en gélose sont encore vivantes après cinq ou six mois.

La dessiccation tue très vite les vibrions, surtout dans les cultures ; dans les matières fécales les vibrions résistent mieux.

Une température de + 50° à 60° tue les vibrions en dix minutes environ, mais des températures très basses (— 10°) sont sans action sur leur vitalité.

Les vibrions sont très sensibles à l'action des antiseptiques : des traces de sublimé, de sulfate de quinine, etc., arrêtent leurs cultures.

A propos du choléra expérimental nous avons insisté sur les variations de la virulence des vibrions; cette virulence s'atténue dans les cultures et s'exalte par les passages chez les animaux réceptifs (Voy. aussi *Toxine*).

Les Vibrions cholériques sont des êtres très sensibles à l'influence des microbes qui les entourent (Metchnikoff).

Nous avons déjà dit que certaines bactéries favorisent le développement des vibrions dans les cultures et dans le tube intestinal; il en est d'autres, au contraire, qui empêchent ce développement, tels sont le Bacille pyocyanique, un coccus blanc isolé de l'eau, etc. Ce coccus blanc a une action remarquable sur les vibrions : pendant les premiers jours il en empêche complètement le développement, puis, au bout de quelque temps, le Vibrion commence à se développer, mais ses colonies sont rares et grêles et constituées non par des bacilles virgules, mais par des formes d'involution en doubles massues (Metchnikoff).

§ 2. — RÉACTIONS BIOCHIMIQUES.

Réaction indol-nitreuse. — Dans les cultures en eau peptonisée le Vibrion du choléra réduit les nitrates pour donner naissance

à des nitrites et produit de l'indol. Quand on verse un acide minéral exempt de produits nitreux (de l'acide sulfurique pur, par exemple) dans une de ces cultures il se produit une réaction rouge caractéristique, c'est la *réaction du kolera-roth* ou *indol-nitreuse* (réaction de Bujwid, de Salkowski). Cette réaction est encore plus apparente si l'on a eu soin d'ajouter un peu de nitrate de potasse dans l'eau peptonisée; on peut utiliser la formule ci-dessous :

Peptone Chapoteau................	10 grammes.
Sel marin........................	5 —
Nitrate de potasse................	1 gramme (non indispensable).
Eau..............................	1 000 grammes.

La solution est alcaline sans addition de soude; la stériliser à 115°.

Le tube d'eau peptonisée, ensemencé avec le Vibrion, est placé à l'étuve à 37°; au bout de vingt-quatre heures on y verse doucement 1 à 2 centimètres cubes d'acide sulfurique ou chlorhydrique purs : il se produit une teinte rose qui s'accentue pendant plusieurs heures.

Tous les Vibrions cholériques ne donnent pas la réaction indol-nitreuse et, par contre, d'autres bactéries peuvent la fournir.

Réaction de l'indol. — Le Vibrion du choléra produisant de l'indol dans les cultures, celles-ci donnent les réactions que nous avons énumérées page 426.

§ 3. — TOXINE.

Le choléra est un empoisonnement aigu causé par l'absorption d'une toxine élaborée dans l'intestin par le Vibrion ; depuis longtemps on s'est préoccupé de l'étude de cette toxine (1).

I. — Brieger et Fränkel décrivent dans les cultures une substance albuminoïde de nature indéterminée qu'ils rapprochent des diastases et nomment *toxalbumine*; Outchinsky montre que le Vibrion élabore cette toxine même dans un milieu exclusivement minéral :

Eau..............................	1 000 grammes.
Glycérine........................	40 —
Chlorure de sodium................	5 —
Chlorure de calcium...............	0,1 centigramme.
Sulfate de magnésium..............	0,2 —
Phosphate de potassium............	2 grammes.
Lactate d'ammonium................	6 —
Asparagine........................	4 —

II. — Petri montre que les cultures qui fournissent le plus de

(1) Nous laisserons de côté les travaux anciens dans lesquels on a recherché et décrit les ptomaïnes du choléra ; nous ne citerons que pour mémoire la théorie d'Emmerich qui voulait que l'intoxication cholérique soit produite par les nitrites élaborés par le Vibrion ; il suffira de dire que les cultures des vibrions ne produisant pas de nitrites sont aussi toxiques que celles qui renferment ces sels.

toxine sont celles qui sont faites dans une solution de peptone à 5 ou 10 p. 100. Les cultures ainsi préparées et stérilisées à 120° sont toxiques pour le cobaye. La toxine cholérique n'est pas détruite par la température de l'ébullition, sa nature diffère donc complètement de celle de la toxine diphtéritique, Petri la désigne sous le nom de *toxo-peptone.*

A la dose de 1 à 2 centimètres cubes injectés dans le péritoine du cobaye, la toxine de Petri produit une maladie mortelle en huit à vingt-quatre heures, débutant après une *incubation* de deux à trois heures et caractérisée par de la somnolence, de l'hypothermie et la production d'une péritonite à exsudat séreux. La culture entière stérilisée par la chaleur est plus active que la culture filtrée.

III. — Hueppe et Scholl objectent aux travaux précédents que dans l'intestin humain le Vibrion prépare sa toxine à l'abri de l'air : les cultures aérobies sont donc impuissantes à fournir la véritable toxine cholérique. Hueppe et Scholl cultivent le Vibrion à l'intérieur d'œufs de poule (Voy. p. 55, A), croyant le placer dans des conditions de vie anaérobie, oubliant la présence de la chambre à air et la porosité de la coquille. La culture développée, les auteurs précipitent le contenu de l'œuf par l'alcool, dissolvent le précipité dans de l'eau stérile et injectent la solution obtenue dans le péritoine de cobayes. Cette solution se montre extrêmement toxique et tue les animaux en quelques minutes, sans période d'incubation. Gruber et Wiener montrent que cet empoisonnement n'a rien de spécifique et est produit par l'hydrogène sulfuré développé dans la culture et par l'alcool employé à la précipitation. Gruber et Wiener confirment les résultats de Petri : la véritable toxine cholérique ne tue les animaux qu'*après une période d'incubation.*

IV. — Gamaléia soutient l'existence de plusieurs toxines cholériques. Des cultures de Vibrion en bouillon de pied de veau sont placées pendant quinze jours à l'étuve à 37°, puis abandonnées quelques jours à la température ordinaire pour que le poison contenu dans le corps des microbes diffuse dans le liquide. Ce liquide de macération contiendrait deux poisons, l'un altérable par la chaleur et provoquant de la diarrhée chez les lapins, l'autre résistant au chauffage et tuant les lapins sans provoquer de diarrhée.

V. — Pour Pfeiffer, la toxine cholérique est adhérente au corps même des vibrions et n'est mise en liberté que lorsque ceux-ci sont morts ou se désagrègent; il en résulte que les toxines solubles rencontrées dans les cultures ne seraient qu'un produit plus ou moins modifié des cadavres microbiens.

Pfeiffer base son affirmation sur ce fait que l'on tue le cobaye en lui

injectant dans le péritoine les vibrions d'une culture récente sur gélose tuée par les vapeurs de chloroforme ou la chaleur.

VI. — Metchnikoff, Roux et Taurelli-Salimbeni démontrent que la toxine cholérique est soluble et qu'elle diffuse pendant la vie des vibrions; ils préparent une toxine qui est analogue à celle que Ransom a obtenue de son côté.

Préparation de la toxine. — 1° Il faut commencer par se procurer un vibrion très virulent. Metchnikoff, Roux et Taurelli-Salimbeni exaltent la virulence de leur vibrion par des passages successifs dans le péritoine du cobaye : ils arrivent à obtenir un microbe tuant le cobaye à la dose de un vingtième de culture sur gélose (inoculation intrapéritonéale). Les mêmes auteurs donnent la préférence au procédé suivant : on prépare de petits sacs de collodion de 3 à 4 centimètres cubes de capacité (technique, p. 182); après avoir stérilisé un de ces sacs on y introduit de l'eau peptonisée ensemencée avec le vibrion et on en referme avec soin l'ouverture. On introduit aseptiquement le sac dans le péritoine d'un cobaye; au bout de quarante-huit heures le sac est retiré de l'abdomen de l'animal (1) et son contenu est inoculé directement dans le péritoine d'un nouveau cobaye; l'exsudat péritonéal de ce second animal fournit la matière d'ensemencement d'un nouveau sac. On fait ainsi plusieurs passages successifs en alternant les ensemencements en sac avec les inoculations directes dans le péritoine. Par ces passages alternatifs, le vibrion prend une telle virulence que le contenu d'un sac tue bientôt un cobaye moyen à la dose de 1/160ᵉ de centimètre cube inoculé dans la cavité péritonéale.

La conservation de la virulence s'obtient en faisant tous les trois ou quatre jours une culture en sac inclus dans le péritoine; le vibrion se trouve ainsi dans les conditions les plus favorables à son développement sans être en contact direct avec les tissus du cobaye : il échappe à l'influence nuisible des phagocytes.

2° Préparer et stériliser dans un matras le milieu nutritif suivant :

Eau	1 000	grammes.
Peptone	20	—
Gélatine	20	—
Sel marin	10	—

Ensemencer avec le contenu d'un sac retiré du péritoine d'un cobaye. Placer à l'étuve pendant quelques heures, jusqu'à apparition d'un trouble manifeste, puis répartir purement la culture dans des

(1) Les cobayes ayant reçu dans le péritoine un sac de 2 à 4 centimètres cubes ensemencé avec un vibrion virulent succombent du troisième au cinquième jour à l'empoisonnement causé par la toxine soluble qui diffuse à travers la paroi du sac.

boîtes de Petri stériles disposées dans une chambre humide à 37° ; dès la douzième heure il existe un voile épais à la surface du liquide des boîtes. La culture obtient son maximum de toxicité le quatrième jour, on la filtre alors sur la bougie Chamberland.

Metchnikoff a montré le rôle favorisant de certains microbes vis-à-vis des cultures du vibrion (Voy. plus haut); nous avons dit qu'une torula retirée de l'estomac de l'homme possédait à un haut degré ces propriétés favorisantes. Une culture de cette torula en bouillon ordinaire, âgée de huit jours et filtrée sur la bougie Chamberland, fournit un liquide non toxique où le vibrion cholérique produit notablement plus de toxine que dans le bouillon neuf.

Propriétés de la toxine. — Le filtrat obtenu est alcalin et doué d'une odeur spéciale; il tue le cobaye à la dose de 0,3 centimètre cube par 100 grammes du poids de l'animal. La toxine n'est pas altérée par la température de l'ébullition ; elle perd son activité au contact de l'air, surtout en présence de la lumière, mais elle la conserve longtemps dans des tubes exactement remplis, scellés à la lampe et placés à l'obscurité. L'alcool absolu et le sulfate d'ammoniaque précipitent le principe actif de la toxine.

Action de la toxine sur les animaux. — De tous les animaux de laboratoire le cobaye de taille moyenne ou petite est le plus sensible à la toxine cholérique ; le cobaye de forte taille résiste mieux. Le poison agit aussi sûrement et aussi rapidement quand on l'inocule sous la peau que quand on l'injecte dans le péritoine. La mort survient en six à trente-six heures avec des doses moyennes (1 centimètre cube sous la peau ou un tiers de centimètre cube dans le péritoine, pour des cobayes de 250 grammes environ); mais en injectant une grande quantité de toxine, la mort peut être produite en quelques minutes, surtout si l'on pratique l'injection dans le péritoine.

Les symptômes de l'intoxication sont analogues à ceux que produit l'inoculation des cultures vivantes, mais ils surviennent plus rapidement : aussitôt après l'injection, l'hypothermie se manifeste : elle se continue jusqu'au moment de la mort, où la température centrale est de 24° à 25°. A l'autopsie on constate un peu d'œdème au point d'inoculation, un peu d'épanchement péritonéal, de l'hyperémie de l'intestin grêle et de l'estomac, de la congestion des viscères abdominaux ; l'intestin est distendu par un liquide diarrhéique.
Quand la quantité de toxine injectée est trop faible, il se produit une élévation passagère de la température, avant l'abaissement, et l'animal se rétablit.

Le lapin résiste mieux à la toxine que le cobaye ; à poids égal, la dose mortelle pour cet animal est supérieure d'un tiers à celle qui tue le cobaye. La souris est encore plus résistante : pour tuer une souris, il faut au moins 1 centimètre cube de toxine injecté sous la peau ou

un tiers de centimètre cube dans le péritoine; c'est-à-dire qu'une souris de 15 grammes résiste à la dose qui tue un cobaye de 250 grammes.

§ 4. — VACCINATION.

I. — Ferran a montré que le cobaye qui a résisté à l'inoculation sous-cutanée d'une petite dose de culture de Vibrion cholérique devient réfractaire aux doses mortelles. Il a tenté d'appliquer à l'homme cette méthode d'immunisation et a pratiqué 50000 vaccinations: après deux inoculations sous-cutanées de ses cultures (légère réaction fébrile) l'homme deviendrait réfractaire au choléra. Malheureusement la réalité de cette hypothèse n'a pas été démontrée.

II. — Haffkine essaye de conférer l'immunité par l'inoculation d'un virus atténué. Il prend un vibrion à virulence exaltée et fixée par une vingtaine de passages dans le péritoine de cobayes et il l'atténue en le cultivant dans du bouillon à 39° en présence d'un courant d'air; il fait ainsi plusieurs cultures successives en réensemençant le vibrion tous les deux ou trois jours; l'injection de ces cultures immunise le cobaye contre l'inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale du virus exalté. Pour vacciner l'homme contre le choléra intestinal, Haffkine injecte d'abord le virus atténué et, huit jours après, une culture virulente. S'il est indiscutable que les vaccins d'Haffkine protègent contre la péritonite cholérique, ils semblent impuissants vis-à-vis du choléra intestinal.

III. — Pfeiffer, Klemperer, Vincenzi, Klein, etc., montrent qu'il est très aisé de protéger le cobaye contre l'infection péritonéale.

L'injection de cultures du Vibrion filtrées ou stérilisées par la chaleur empêche le développement ultérieur de la péritonite cholérique (Klemperer, Vincenzi). Klein démontre que cette vaccination peut s'obtenir par l'injection de produits de microbes autres que celui du choléra : une culture chauffée de *Micrococcus prodigiosus*, injectée à petites doses, vaccine le cobaye contre des doses mortelles de Vibrion. Israël voit que l'injection intrapéritonéale de bouillon neuf protège les cobayes contre la péritonite vibrionienne; les injections de sérum humain (Voy. plus loin), de solution physiologique de chlorure de sodium, d'urine, agissent de même (Israël, Metchnikoff). L'injection de ces substances a pour effet d'exciter la fonction phagocytaire : les leucocytes englobent les vibrions inoculés et l'évolution de la péritonite est arrêtée.

IV. — Metchnikoff, Roux et Taurelli-Salimbeni montrent que les animaux s'accoutument très rapidement à la toxine cholérique : les cobayes, les lapins, les chevaux, les chèvres sont susceptibles d'être immunisés par l'injection de toxine.

Les cobayes et les lapins traités par de petites doses de toxine présentent après chaque injection une hyperthermie de courte durée suivie d'une hypothermie modérée qui dure environ vingt heures ; les injections répétées amènent un amaigrissement, passager chez les cobayes, plus durable chez les lapins ; il est alors nécessaire d'interrompre l'immunisation jusqu'à ce que les animaux aient repris leur poids initial.

La chèvre réagit, par une élévation de température, à l'injection de 2 à 5 centimètres cubes de toxine ; la réaction s'atténue à mesure que l'accoutumance s'établit.

Les chevaux réagissent vivement à l'injection de 10 centimètres cubes de toxine et présentent un œdème notable au point d'inoculation ; on renouvelle les injections tous les dix ou quinze jours et on arrive à leur faire supporter au bout de six mois des doses de 200 centimètres cubes injectées en un seul coup.

§ 5. — SÉROTHÉRAPIE.

I. — Klemperer montre que le sérum des animaux vaccinés contre le Vibrion présente des propriétés préventives.

II. — Lazarus constate que le sang d'individus guéris du choléra possède un pouvoir préventif considérable : dans certains cas, un centimètre cube du sérum extrait de ce sang protège le cobaye contre la péritonite vibrionienne. La propriété préventive du sang ne joue aucun rôle dans la guérison du choléra humain : Metchnikoff et Klemperer ont montré que le sérum d'hommes n'ayant jamais eu le choléra possède parfois cette propriété. De plus, Metchnikoff a vu que le pouvoir préventif peut être très développé dans le sang d'individus venant de succomber au choléra et qu'il manque souvent chez les cholériques convalescents.

III. — Pfeiffer étudie les propriétés du sang des animaux vaccinés par injection de Vibrions cholériques (Voy. plus haut). Il obtient un sérum actif au quinzième de milligramme, c'est-à-dire dont un quinzième de milligramme suffit à vacciner un cobaye contre la péritonite cholérique quand on l'injecte, avant, en même temps, ou dans les quinze minutes qui suivent l'inoculation du Vibrion. Ce sérum n'est pas bactéricide, mais il possède des *propriétés agglutinantes* vis-à-vis du Vibrion du choléra.

Metchnikoff a montré que le sérum de Pfeiffer *ne possède pas de propriétés antitoxiques* ; il est extrêmement efficace contre l'envahissement du sang et des organes par le Vibrion, parce qu'il excite la fonction phagocytaire et permet l'englobement du microbe par les leucocytes, mais il est totalement inefficace contre le choléra intestinal, qui est une intoxication.

Pfeiffer a proposé d'utiliser la propriété immunisante du sérum des animaux vaccinés pour différencier le Vibrion du choléra des espèces voisines ; d'après lui, le sérum d'un animal vacciné contre

le choléra protège le cobaye contre l'infection par le seul Vibrion cholérique et non contre les vibrions voisins; pour être fixé sur la nature d'un vibrion, il suffirait dès lors d'inoculer ce vibrion à un cobaye traité par du sérum anticholérique, l'animal ne résisterait qu'au cas où le vibrion inoculé appartiendrait au groupe des cholérigènes (1). Metchnikoff a montré le peu de valeur de cette épreuve : la *réaction d'immunité* peut manquer vis-à-vis de vibrions isolés de selles cholériques et se rencontrer avec des vibrions saprophytes.

IV. — Metchnikoff, Roux et Taurelli-Salimbeni étudient les propriétés du sérum de leurs chevaux immunisés par la toxine (Voy. plus haut). Ce sérum est *préventif* contre la péritonite cholérique du cobaye, la dose préventive est comprise entre 0,01 et 0,005 centimètre cube. Il est *antitoxique* : 2 centimètres cubes neutralisent quatre fois la dose mortelle de toxine. — Injecté à la dose de 4 à 8 centimètres cubes sous la peau de petits lapins avant l'ingestion de Vibrion cholérique, ce sérum se montre préventif contre le choléra intestinal : sur 100 lapins traités par le sérum 56 ont échappé au choléra, tandis que chez les témoins la proportion des survivants n'a été que de 16 p. 100. Le sérum est efficace quand il est injecté au moment même de l'ingestion du virus, mais il échoue totalement à guérir les animaux qui ont ingéré le Vibrion depuis vingt-quatre heures.

AGGLUTINATION.

Pfeiffer a constaté *in vivo* les propriétés agglutinantes du sérum des animaux immunisés.

Pfeiffer injecte dans le péritoine d'un cobaye neuf une émulsion de Vibrions cholériques mélangée à un peu de sérum préventif (animal immunisé ou homme convalescent du choléra) ; au bout de dix à trente minutes le liquide péritonéal examiné au microscope ne montre plus que des microbes arrondis, immobiles (*Phénomène de Pfeiffer*).

L'agglutination et la transformation granuleuse du Vibrion par le sérum préventif peuvent également s'obtenir *in vitro* (Metchnikoff, Bordet).

Pour obtenir cette agglutination, on doit s'adresser à une culture sur gélose dont on délaye une petite quantité dans un peu de bouillon stérile ; on examine l'émulsion au microscope pour s'assurer qu'elle ne contient pas de grumeaux ,puis on y ajoute 1 p. 10 à 1 p. 20 de sérum préventif; l'agglutination ne se produit qu'au bout de quelques instants, elle atteint son maximum quand le mélange a séjourné deux heures à l'étuve à 37°.

(1) Avoir soin, bien entendu, d'inoculer avec le vibrion à éprouver un cobaye témoin qui ne recevra pas de sérum.

Bossaërt immunise une chèvre par injections d'émulsion de Vibrions cholériques tués par la chaleur (60°) ou le chloroforme. Le sérum et le lait de l'animal, à une certaine dilution (1), n'agglutinent que le microbe spécifique lui-même, à l'exclusion des espèces voisines; en poussant plus loin la dilution, le sérum de l'animal fortement immunisé n'agglutine plus que le microbe ayant servi à la vaccination, à l'exclusion des Vibrions cholériques de même espèce mais d'autre provenance.

Applications. — Le phénomène de l'agglutination fournit un procédé de diagnostic du Vibrion : en règle, le Vibrion du choléra seul est agglutiné par le sérum des animaux vaccinés contre le choléra; l'examen pratiqué *in vitro*, comme nous l'avons dit plus haut, constitue un bon signe d'identification du Bacille virgule; malheureusement la valeur de ce signe n'est pas absolue, la réaction manquant parfois avec des vibrions isolés de selles cholériques et pouvant se produire avec des vibrions dépourvus de tout pouvoir pathogène.

Agglutination par les substances chimiques. — Une partie de solution de *chrysoïdine* à 0gr,25 p. 100, mélangée à cinq parties d'émulsion du Vibrion cholérique ou des vibrions voisins, donne lieu au phénomène de l'agglutination (Blachstein).

Les solutions de *sublimé* à 1 p. 1000, de *formaline* à 25 p. 100, de *safranine* à 0,25 p. 1000 agglutinent certaines espèces vibrioniennes; le sublimé, en particulier, agglutine de préférence les Vibrions pseudo-cholériques (Bossaërt); il ne semble pas qu'on puisse tirer de ces faits une application utile pour le diagnostic des vibrions.

Article IV. — RECHERCHE ET DIAGNOSTIC DES VIBRIONS.

La recherche des vibrions est aisée, mais la détermination et l'identification des Vibrions cholériques présentent au contraire de grandes difficultés.

§ 1er. — RECHERCHE.

A. — *EXAMEN MICROSCOPIQUE.*

Ce mode d'investigation ne s'applique qu'à la recherche du Vibrion dans les fèces, les exsudats et les tissus des animaux.

Recherche dans les fèces. — Prendre un petit grumeau muqueux ou riziforme, l'étaler sur une lamelle et colorer le frottis par la fuchsine de Ziehl diluée. Dans les cas types, cette épreuve est concluante : les vibrions existent à peu près en culture pure, ils sont groupés en

(1) Le sérum de certaines chèvres, à l'état normal, agglutine à 1 p. 50 le Vibrion de Koch et les espèces pseudo-cholériques; l'immunisation contre le choléra ne modifie en rien le pouvoir agglutinant vis-à-vis de ces dernières espèces.

bancs où les microbes sont tous orientés dans le même sens, comme des poissons dans l'eau. Mais le plus souvent, au contraire, l'examen microscopique ne fournit aucune donnée concluante. En tous cas, la recherche devra toujours être complétée par l'ensemencement des matières fécales.

On obtient de belles préparations en pratiquant une double coloration : le frottis est d'abord soumis à la méthode de Gram, puis il est coloré par la fuchsine de Ziehl diluée : les vibrions sont rouges, les microbes prenant le Gram sont teintés en violet.

Coloration des coupes. — Les coupes d'intestin seront colorées par le procédé de Nicolle au tannin.

B. — CULTURES.

I. **Fèces.** — Le procédé primitivement employé consistait à pratiquer avec les matières fécales des isolements sur plaques de gélatine en boîtes de Petri, mais les plaques sont fréquemment envahies par des microbes étrangers et la recherche est interrompue. On donnera la préférence au procédé suivant :

Procédé de choix (Metchnikoff). — 1° Préparer des tubes de solution gélo-pepto-sel de Metchnikoff (Voy. p. 32), les ensemencer avec un peu de matières cholériques et les placer à l'étuve à 37°.

2° Dès la troisième ou quatrième heure il se produit un trouble dans les tubes et vers la septième heure il existe un léger voile à la surface du liquide. Une trace de ce voile est examinée au microscope : d'ordinaire la culture est impure et, à côté des vibrions, il existe d'autres formes microbiennes.

3° Pour purifier la culture on peut pratiquer un second passage en milieu gélo-pepto-sel (ensemencer une trace du voile dans un tube neuf et reprendre la culture au bout de six à sept heures), mais il suffit d'ordinaire de pratiquer de suite un isolement sur gélose :

On coule un tube de gélose liquéfiée dans une boîte de Petri, on laisse solidifier la plaque et on pratique à sa surface un isolement en stries avec une öse chargée d'une trace du voile de la culture (Voy. p. 89). La plaque est portée à l'étuve à 37° ; au bout de quelques heures apparaissent de petites colonies minces, transparentes, opalescentes, jamais opaques, que l'on peut prélever dès la sixième ou huitième heure. L'isolement est alors terminé : il n'a demandé au total qu'une quinzaine d'heures.

En même temps que l'isolement en stries sur gélose, on peut pratiquer un isolement sur plaques de gélatine : ces plaques, examinées ultérieurement, fourniront un élément de diagnostic.

II. **Eau.** — *Procédé de choix* (Metchnikoff). — 1° Préparer des fioles

de Vivien de 250 centimètres cubes environ ; les jauger à 200 centimètres et marquer sur le verre un repère avec un trait de diamant.

2° Dans chaque fiole verser la solution suivante :

Eau	50 centimètres cubes.
Peptone Chapoteau	2 grammes.
Sel marin	2 —
Gélatine	4 —
Solution de soude	Q. S. pour légère alcalinité.

Stériliser à l'autoclave.

3° Ajouter au contenu de chaque fiole 150 centimètres cubes de l'eau suspecte (jusqu'au trait de jauge de la fiole) et porter le tout à 37°. Quand l'eau contient des vibrions, au bout de huit à dix heures il se forme un voile à la surface du liquide. On prélève une trace de ce voile, on l'examine, on fait un ou deux passages successifs dans des tubes de gélo-pepto-sel et on termine au besoin par un isolement sur gélose comme nous l'avons dit plus haut.

§ 2. — IDENTIFICATION.

Quand on a isolé un vibrion de matières fécales ou d'une eau, il faut rechercher si ce microbe rentre bien dans la catégorie des Vibrions cholériques, un certain nombre de vibrions devant être considérés comme saprophytes. Les espèces vibrioniennes rencontrées dans les eaux par Metchnikoff, Blachstein, Sanarelli, sont très nombreuses: Sanarelli en a décrit trente-deux dans les eaux de Paris.

En réalité, il n'existe pas un seul caractère pathognomonique du Vibrion du choléra et, en présence de certains vibrions rencontrés dans les eaux en dehors de toute épidémie, on peut se trouver dans l'impossibilité de poser un diagnostic. On donne d'ordinaire comme caractères classiques du Vibrion du choléra :

1° L'aspect des cultures sur gélatine (plaques et piqûres) ;

2° La présence et le nombre des cils ;

3° La réaction indol-nitreuse dans les cultures en eau peptonée ;

4° La non-coagulation du lait ;

5° La virulence pour le cobaye ;

6° L'agglutination par le sérum anticholérique ;

7° La production de la réaction d'immunité de Pfeiffer.

Après ce que nous avons dit au cours de ce chapitre, il est inutile de revenir sur l'inconstance de ces caractères. La meilleure épreuve d'un vibrion consisterait peut-être *à le faire ingérer à de jeunes lapins*, seul ou associé aux microbes favorisants du choléra. Quoi qu'il en soit, la variabilité morphologique des vibrions rend souvent leur identification fort difficile.

LE VIBRION DE FINKLER-PRIOR.

Ce vibrion a été découvert par Finkler et Prior dans les selles d'un homme atteint d'entérite aiguë, il aurait été retrouvé par les mêmes auteurs dans les matières fécales de malades atteints de choléra nostras et peut-être par Ruete et Enoch dans les selles d'une femme atteinte d'une diarrhée mortelle. Le vibrion décrit par Rommelaer comme Vibrion de Finkler rentre en réalité dans la catégorie des Vibrions de Koch.

Inoculations. — Le Vibrion de Finkler-Prior injecté dans le péritoine du cobaye détermine une péritonite vibrionienne mortelle; injecté dans le muscle pectoral, il amène la mort du pigeon. Une culture sur gélose, absorbée après alcalinisation de l'estomac, a produit chez l'homme de légers troubles intestinaux (Metchnikoff).

Aspect microscopique. — L'aspect microscopique du Vibrion de Finkler est analogue à celui du Vibrion de Koch, cependant le Vibrion de Finkler est légèrement renflé à sa partie moyenne et s'effile aux extrémités. Il possède les mêmes affinités pour les couleurs que le Vibrion cholérique et ne prend pas le Gram. Il est mobile et possède un cil vibratile.

Caractères des cultures. — Les cultures ressemblent à celles du Vibrion cholérique ; cependant la liquéfaction de la gélatine est plus rapide avec le Finkler et il ne se forme pas de bulle d'air à la surface de la cupule de liquéfaction.

Caractères biologiques. — Le Vibrion de Finkler produit de l'indol, mais il ne fabrique que des traces minimes de nitrites : la réaction indol-nitreuse est positive, mais très peu marquée et lente à se produire.

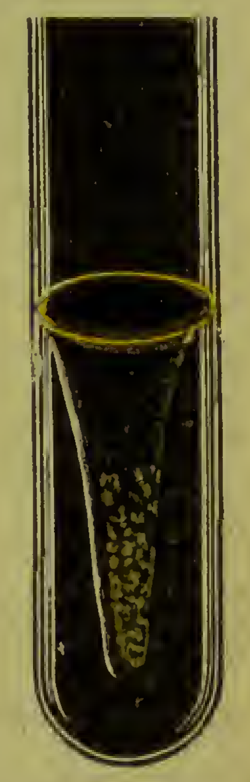


Fig. 223. — Vibrion de Finkler-Prior. Piqûre en gélatine, quatrième jour.

LE VIBRION DE DENEKE.

Ce vibrion a été isolé d'un vieux fromage par Deneke. Sa morphologie est analogue à celle du Vibrion cholérique, l'aspect des colonies sur plaques de gélatine peut être identique à celui des colonies du Vibrion de Koch ; il liquéfie la gélatine un peu plus vite que le Vibrion de Koch, mais moins vite que celui de Finkler-Prior.

L'inoculation intrapéritonéale tue le cobaye (Hueppe, Metchnikoff). Le Vibrion de Deneke est également pathogène pour le pigeon (Kasanky, Metchnikoff). L'ingestion de ce vibrion est susceptible de produire de la diarrhée chez l'homme (Metchnikoff).

Le Vibrion de Deneke produit de l'indol, mais très peu de nitrites ; il donne irrégulièrement et très faiblement la réaction du choléra-roth.

VIBRIO METCHNIKOWI.

VIBRION AVICIDE.

Le *Vibrio Metchnikowi*, découvert par Gamaléia, est l'agent d'une maladie observée chez les poules à Odessa. Cette maladie se traduit par de l'abattement, de la somnolence et de la diarrhée; à l'autopsie, le tube digestif est hyperémié, l'intestin grêle contient un liquide gris jaunâtre, quelquefois teinté de sang. Le vibrion se trouve en abondance dans ce liquide; en règle, le vibrion ne passe pas dans le sang; on peut cependant le rencontrer dans le sang des jeunes poulets atteints.

Inoculations. — Le cobaye est plus sensible au Vibrion avicide qu'au Vibrion du choléra : il succombe aux inoculations intrapéritonéale, sous-cutanée et même à la simple ingestion sans alcalinisation préalable de l'estomac.

Le Vibrion avicide tue les jeunes poulets, quel que soit le mode d'inoculation : la simple ingestion suffit à leur conférer la maladie mortelle. Les poules adultes sont beaucoup moins réceptives et résistent toujours à l'ingestion. Les pigeons, très sensibles à l'inoculation sous-cutanée ou intra-musculaire, résistent à l'ingestion.

L'absorption du Vibrion avicide ne produit aucun trouble morbide chez l'homme.

Aspect microscopique. — La forme du Vibrion avicide est la même que celle du Vibrion du choléra; parfois le *Vibrio Metchnikowi* constitue des spirales de quatre à cinq tours; le vibrion est mobile et possède un seul cil vibratile.

Caractères des cultures. — Le Vibrion avicide cultive sur tous les milieux ordinaires; les caractères des cultures sont analogues à ceux du Vibrion de Koch. Sur pomme de terre, la culture du Vibrion avicide est plus abondante que celle du Vibrion de Koch et forme une strie jaune brun. Les cultures en lait deviennent à la longue très acides et la caséine se coagule vers le huitième jour.

Caractères biologiques. — Le *Vibrio Metchnikowi* prépare de l'indol et des nitrites dans les solutions de peptone; il donne très nettement la réaction indol-nitreuse.

CHAPITRE XXIX

LE MICROBE DE LA PÉRIPNEUMONIE DES BOVIDÉS

Jusqu'à ces dernières années toutes les recherches avaient échoué à déceler le microbe de la péripneumonie contagieuse des bovidés. En 1898, Nocard et Roux imaginèrent une nouvelle méthode de recherche qui aboutit à la découverte de ce microbe. « La découverte de l'agent de la virulence péripneumonique, écrivent Nocard et Roux, n'offre pas seulement l'intérêt de la difficulté vaincue ; sa portée est plus haute. Elle donne l'espoir de réussir également dans l'étude de tels autres virus dont le microbe est resté jusqu'à présent inconnu. »

La péripneumonie contagieuse sévit à l'état aigu et à l'état chronique. Dans la péripneumonie aiguë, les troubles respiratoires dominent : on note l'accélération des mouvements thoraciques, de la submatité, du souffle bronchique avec diminution de la respiration, une toux fréquente, du jetage ; l'animal présente de l'anorexie, la rumination est suspendue ; la maladie peut aboutir à la guérison, à l'état chronique ou à la mort. La péripneumonie chronique peut s'établir d'emblée ou succéder à la maladie aiguë ; les poumons s'infiltrent, s'hépatisent sur une grande étendue ; l'incurabilité est la règle.

La lésion essentielle de la péripneumonie consiste en la distension des mailles du tissu conjonctif interlobulaire par une grande quantité de sérosité ambrée et limpide.

Article I. — INOCULATIONS. — VACCINATION.

Willems a montré que la sérosité péripneumonique est inoculable aux bovidés. La chèvre, le mouton, le porc, le chien, le cobaye, le lapin, les oiseaux, sont réfractaires.

L'inoculation d'une goutte de sérosité péripneumonique fraîche dans le tissu cellulaire sous-cutané de la vache confère à l'animal, après une période d'incubation de huit à vingt-cinq jours, une maladie dont la sévérité varie avec le lieu d'inoculation.

I. — Quand l'injection a été pratiquée sous la peau du tronc ou de l'encolure, on observe une fièvre intense, un engorgement inflammatoire énorme, chaud, douloureux, qui peut envahir tout le tissu

cellulaire du tronc; la maladie aboutit le plus souvent à la mort ; si la vache résiste, elle est devenue réfractaire à l'inoculation comme à la contagion naturelle. Quand l'animal a succombé, on trouve a l'autopsie les mailles du tissu conjonctif distendues par une sérosité limpide, tellement abondante qu'on peut parfois en recueillir plusieurs litres. L'œdème n'envahit jamais le poumon ni les viscères, l'animal meurt par intoxication.

II. — Si, au contraire, l'injection est pratiquée dans le tissu cellulaire dense de l'extrémité de la queue, la maladie est bénigne, l'engorgement est peu marqué, peu étendu, la guérison survient de bonne heure, sauf rares exceptions, et l'animal a acquis l'immunité.

Ces constatations ont permis à Willems de créer la vaccination contre la péripneumonie, mais son procédé, qui exige l'inoculation d'une goutte de sérosité pulmonaire dans le tissu cellulaire de la queue, est difficile à appliquer : la sérosité perd facilement sa virulence et il faut la prélever sur un animal récemment abattu. Lorsque Pasteur eut démontré que la sérosité recueillie purement conserve ses propriétés pendant plusieurs semaines, la vaccination devint plus aisée : on inocule une goutte de sérosité pulmonaire à un veau et l'on peut recueillir une véritable provision de virus qui conserve son activité pendant vingt à trente jours ; après quatre à six semaines son inoculation reste sans effet, d'où la nécessité, dans les pays où l'on pratique régulièrement les vaccinations préventives, d'avoir des centres vaccinogènes où l'on fait l'inoculation au veau et la récolte du virus au moins une fois chaque mois.

Article II. — RECHERCHE ET CARACTÈRES DU MICROBE (1).

Le microscope et les méthodes ordinaires de culture restant impuissants à déceler l'existence d'un microorganisme dans le virus péripneumonique, Nocard et Roux pensèrent à soumettre la sérosité à l'épreuve de la culture en sac de collodion.

Les sacs de collodion, préparés selon la technique indiquée page 182, emplis de bouillon ensemencé avec une goutte de sérosité péripneumonique, sont insérés dans la cavité péritonéale du lapin. Au bout de quinze à vingt jours, leur contenu est devenu trouble, opalin, légèrement albumineux (2).

(1) La substance de cet article est empruntée au mémoire de MM. Nocard et Roux. publié avec la collaboration de MM. Borrel, Salimbeni et Dujardin-Beaumetz, dans les *Annales de l'Institut Pasteur* (1898).

(2) Le contenu de sacs témoins, préparés de même, mais non ensemencés avec la sérosité, reste limpide dans les mêmes conditions.

L'examen microscopique de ce liquide trouble, pratiqué avec un grossissement de 2 000 diamètres environ, y montre un grand nombre de petits points réfringents, mobiles, si petits que, même après coloration, on ne peut en déterminer exactement la forme.

Tous les réensemencements pratiqués, avec le contenu des sacs, dans les milieux ordinaires échouent, mais on peut faire des passages en série en sacs inclus dans le péritoine des lapins.

Les lapins chez lesquels on pratique cette opération ne tardent pas à présenter certains troubles ; quand on retire les sacs, au bout de quinze à vingt jours, on constate que les animaux sont fort amaigris ; parfois même ils succombent avant le vingtième jour dans un état d'émaciation extrême sans aucune lésion appréciable, tous leurs organes et leurs humeurs restant stériles. Or les animaux ayant reçu des sacs semblables, mais non ensemencés, ne présentent aucun trouble : il faut donc admettre une intoxication due à la diffusion des produits élaborés par le microbe ; le lapin est sensible à la toxine d'un organisme vis-à-vis duquel il est tout à fait réfractaire.

Les tentatives de cultures échouent dans les sacs de collodion placés dans l'abdomen du cobaye.

Après de longues recherches, Nocard et Roux sont parvenus à composer un milieu artificiel apte à la culture *in vitro* du microbe de la péripneumonie. C'est un mélange de vingt à vingt-cinq parties de la solution de peptone de Martin (Voy. p. 31) avec une partie de sérum de lapin ou de vache. Des tubes de ce mélange, ensemencés aérobiquement avec une goutte de sérosité péripneumonique ou du contenu trouble d'un sac de collodion et placés à l'étuve à 37°, donnent une culture semblable à celle qu'on obtient dans les sacs. Bien plus, le microbe y conserve intacte sa virulence, tandis que celle-ci semble s'affaiblir par les passages dans l'organisme du lapin. Dans le milieu de Nocard et Roux on peut faire de longues séries de cultures.

L'inoculation des cultures obtenues par les procédés de Nocard et Roux confère à la vache la maladie expérimentale caractéristique ; l'animal succombe parfois ; quand il guérit, il est devenu réfractaire aux nouvelles inoculations de culture ou de sérosité péripneumoniques.

CHAPITRE XXX

LE BACILLE DE LA TUBERCULOSE

Le Bacille de Koch est l'agent de la tuberculose de l'homme et des animaux. Straus et Gamaléia attribuaient la *tuberculose aviaire* à un microbe spécial, constituant une espèce à côté du Bacille humain; l'identité des Bacilles humain et aviaire, soutenue depuis longtemps par Arloing, Dor et Courmont, a été récemment démontrée par Nocard : le Bacille de la tuberculose aviaire n'est qu'une variété ou une race du Bacille de Koch.

Nocard est arrivé à transformer le Bacille humain en Bacille aviaire par des passages prolongés en sac de collodion dans le péritoine de la poule. Il emplit un sac de collodion (technique, p. 182) avec une émulsion épaisse de Bacille humain obtenue avec une culture sur pomme de terre glycérinée. Le sac, après un séjour d'au moins quatre mois dans le péritoine d'une poule, contient un limon épais de bacilles dont l'ensemencement donne une culture grêle d'abord, devenant luxuriante par les repiquages et présentant les caractères des cultures du Bacille aviaire (enduit mou, gras, onctueux, plissé, facile à dissocier). Le bacille ainsi obtenu est peu virulent pour le cobaye, au contraire il est très actif vis-à-vis du lapin, qu'il tue avec une tuberculose miliaire généralisée; au deuxième passage par le lapin, il tue cet animal, comme le véritable Bacille aviaire, par septicémie tuberculeuse, sans granulations apparentes : les pulpes d'organes contiennent le bacille en culture pure. Après trois passages de six à huit mois en sacs de collodion, le Bacille humain tue la poule avec des symptômes identiques à ceux de la maladie naturelle.

Nous ne séparerons pas la description des Bacilles humain et aviaire; dans chaque paragraphe nous mettrons en lumière les différences qui les séparent.

Nous conformant à l'usage établi, nous continuons à appeler *bacille* l'agent de la tuberculose, bien que les auteurs soient d'accord aujourd'hui pour le placer dans le groupe des *streptothricées;* Metchnikoff a proposé de le dénommer *Sclerothrix Kochii.*

Tuberculose humaine. — L'homme contracte la tuberculose par les voies respiratoires ou digestives, plus rarement par la voie

génitale ou cutanée. Le Bacille de Koch se rencontre dans toutes les manifestations de la tuberculose de l'homme.

On a voulu opposer à la tuberculose des viscères, des séreuses pleurales et abdominales, celle qui affecte la peau, les ganglions, les articulations, etc., et, d'après Arloing, ces *tuberculoses chirurgicales* seraient dues à un bacille atténué constituant une race; il y a plutôt lieu d'admettre que le bacille conserve sa pleine virulence dans ces tuberculoses locales et que leur peu de tendance à l'extension résulte de causes telles que la résistance particulière de l'organisme envahi, l'influence du lieu où se produit la culture, le petit nombre des microbes envahisseurs qui se développent mal dans un terrain peu favorable.

Tuberculose des animaux. — La plupart des espèces domestiques sont sujettes à la tuberculose.

Bovidés. — Les bovidés adultes sont fréquemment tuberculeux (3 à 60 p. 100 suivant les régions); les veaux sont très rarement tuberculeux (1 p. 10 000 au plus).

Le plus souvent, chez le bœuf, la maladie a une marche chronique; l'animal tuberculeux peut conserver longtemps son embonpoint; les voies respiratoires sont seules atteintes; on trouve dans les poumons des masses volumineuses (*pommelière*) parfois infiltrées de sels calcaires; les plèvres et surtout les ganglions bronchiques sont atteints en même temps; parfois les lésions envahissent l'abdomen, les ganglions mésentériques, le foie, plus rarement la rate et les reins.

Quelquefois la tuberculose se localise exclusivement sur les voies digestives : les organes lymphoïdes de l'intestin, les ganglions, le péritoine, le foie et la rate sont envahis. On peut encore rencontrer chez les bovidés d'autres manifestations locales, telle que la tuberculose mammaire (environ 1 fois sur 100 animaux tuberculeux), des tuberculoses osseuses, etc.

Enfin la tuberculose bovine peut se présenter sous la forme d'une infection générale à marche rapide rappelant la granulie de l'homme.

Singe. — Dans nos climats, le singe devient fréquemment tuberculeux; la tuberculose du singe évolue d'une façon analogue à la tuberculose humaine ; elle est remarquable par sa tendance à la généralisation ; la tuberculose pulmonaire est la forme la plus fréquente.

Chien. — Le chien est assez souvent tuberculeux (Cadiot); ce fait a longtemps été méconnu; chez le chien, les lésions prennent fréquemment l'aspect de productions cancéreuses et on les considérait comme des néoplasmes; quelquefois cependant, on rencontre des lésions analogues à celles de l'homme et particulièrement des cavernes pulmonaires.

Porc. — Un à 10 p. 1 000 des porcs tués dans les abattoirs sont tuberculeux.

La tuberculose du porc atteint d'ordinaire les voies digestives; on a signalé chez le porc des otites tuberculeuses, probablement secondaires à

des lésions du pharynx propagées par la trompe d'Eustache. Les tuberculoses respiratoires et locales (cerveau, mamelle, etc.) sont rares; on signale des formes à évolution rapide analogues à la granulie de l'homme.

Lapin. — Il y a lieu d'en appeler de l'aphorisme si souvent cité : « Le lapin est follement tuberculeux ». La tuberculose spontanée est plutôt rare chez le lapin ; elle revêt la forme pulmonaire.

Chèvre et mouton. — La chèvre et le mouton peuvent contracter la tuberculose; cette affection, pour être rare chez ces animaux, n'est point exceptionnelle.

Cheval. — La tuberculose est rare chez le cheval ; la forme abdominale est la plus fréquente ; parfois on observe les formes pulmonaires : granulie, infiltration diffuse, tumeurs volumineuses d'apparence sarcomateuse.

Chat. — Le chat est rarement tuberculeux ; les lésions affectent chez lui les mêmes formes que chez le chien ; les localisations intestinales sont les plus fréquentes.

Oiseaux. — Les oiseaux, poules, faisans, pintades, perdrix, paons, perroquets, sont très fréquemment tuberculeux.

Les oiseaux s'inoculent d'ordinaire par l'intestin, en ingérant des crachats humains ou des déjections d'animaux tuberculeux : le foie et la rate sont le siège de prédilection des tubercules; rarement on observe des lésions pulmonaires ; le poumon peut cependant être envahi à la dernière période de la maladie; on rencontre rarement, sauf chez le perroquet, des tuberculoses de la peau, des muqueuses et des articulations.

L'aspect histologique des lésions tuberculeuses aviaires diffère de celui des tubercules des mammifères ; cet aspect varie d'ailleurs d'une espèce à l'autre; fréquemment, on trouve une infiltration des viscères par les bacilles, sans tubercules apparents.

Vertébrés à sang froid. — On a signalé des lésions tuberculeuses chez le boa, le python, la couleuvre à collier, la grenouille. Dubard a étudié une tuberculose de la carpe, produite par un bacille au moins très voisin du Bacille humain.

Le *Bacille de la tuberculose pisciaire* présente les réactions du Bacille de Koch, mais il pousse mieux à la température ordinaire qu'à 37°. Les cultures venant de la carpe sont pathogènes pour la grenouille, le crapaud, le lézard, la tortue, la couleuvre, le cyprin, la carpe, etc., elles sont inactives pour le cobaye et les oiseaux; cependant, des passages par le cobaye les rendent virulentes pour cet animal ; le Bacille pisciaire se comporte dans l'organisme du lapin et du cobaye de la même façon que le Bacille humain rendu avirulent par des cultures prolongées sur les milieux artificiels (Krompecher). La tuberculine du Bacille pisciaire, que Ramond et Ravant croyaient identique à la tuberculine du Bacille humain, ne donne pas, à la dose ordinaire, la réaction de la tuberculine de Koch, elle est analogue au produit formé dans les cultures par le Bacille humain avirulent (Krompecher).

Associations microbiennes. — Le Bacille de Koch se trouve fréquemment associé, dans les lésions tuberculeuses, à différents microbes, d'ordinaire pyogènes. Dans les cavernes pulmonaires on trouve une riche flore microbienne; à côté des Bacilles tuberculeux se développent les Staphylocoques pyogènes, le Streptocoque, le Pneumobacille, le Pneumocoque, le Bacille du pus bleu, le *Micrococcus tetragenus*, les bactéries de la putréfaction, etc. La fièvre hectique des tuberculeux est due à la résorption des toxines sécrétées par ces microbes. Dans les ganglions tuberculeux, les lésions des méninges, etc., on trouve fréquemment le Pneumocoque, le Streptocoque, les Staphylocoques, associés au Bacille tuberculeux.

Article I. — TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE.

On pratique d'ordinaire les inoculations chez le cobaye et le lapin, avec une culture pure délayée dans un peu d'eau stérile ou avec des produits tuberculeux également broyés dans quelques gouttes d'eau ou insérés en nature sous la peau (crachats, pus, fragments de tissus), ou dans le péritoine (tissus).

Cobaye. — Tout cobaye inoculé avec une substance contenant des bacilles, même en petit nombre, prend la tuberculose.

Inoculation sous-cutanée. — Après une dizaine de jours, il se forme, au lieu d'inoculation, un petit nodule induré, puis le nodule se ramollit et s'abcède; l'abcès s'ouvre au dehors et il s'établit un ulcère : le *chancre tuberculeux*. En même temps, les ganglions voisins se tuméfient; l'animal maigrit, se cachectise et la mort survient au bout d'un à trois mois. A l'autopsie, les lésions de la rate et du foie dominent ; la rate est volumineuse, ocreuse, semée de tubercules caséeux et de granulations jaunes plus récentes; les points caséeux peuvent confluer pour former des masses irrégulières, mamelonnées, blanc jaunâtre; le foie présente des lésions analogues, mais en général moins marquées. Sur les séreuses, à la surface des poumons, des reins, appa-

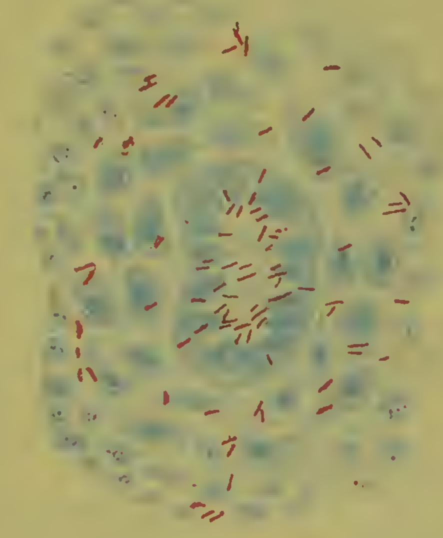


Fig. 224. — Follicule tuberculeux; stade de début (demi-schématique).

raît un fin semis de granulations miliaires. Les ganglions lymphatiques avoisinant la lésion d'inoculation sont caséeux. En sacrifiant l'animal, quinze à vingt jours après l'inoculation, on trouve déjà des lésions caractéristiques, et particulièrement les tubercules de la rate et du foie.

Ce tableau symptomatique a été décrit pour la première fois par Villemin, d'où le nom de *type Villemin*, sous lequel on désigne cette forme de généralisation tuberculeuse.

Inoculation intrapéritonéale. — L'évolution se fait suivant le type précédent, mais est plus rapide. La mort, précédée par une cachexie progressive, survient en deux à six semaines. Les viscères présentent les lésions signalées plus haut ; la lésion chancreuse n'existe pas, mais le péritoine est infiltré de tubercules et forme une masse compacte, caséeuse. Les ganglions mésentériques et inguinaux ont subi la dégénérescence caséeuse.

L'injection intrapéritonéale d'une dose considérable de cultures de la tuberculose humaine tue le cobaye en quelques jours; à l'autopsie, on constate un épanchement séreux dans les plèvres, mais on ne trouve pas de tubercules visibles dans les organes (Koch, Straus et Gamaléia).

Inoculation intrapulmonaire. — Au niveau du point de pénétration de l'aiguille, il se produit un foyer de caséification ; aux alentours, les poumons sont envahis par des granulations grises. Les viscères abdominaux présentent les mêmes lésions que dans l'inoculation sous-cutanée.

Inhalation. — Les cobayes prennent aisément la tuberculose quand on les fait respirer dans une atmosphère chargée de crachats desséchés et finement pulvérisés ou de poussières mêlées à des cultures du Bacille de Koch ; l'animal succombe avec des lésions très prononcées de broncho-pneumonie caséeuse.

Ingestion. — Villemin et Parrot, Klebs ont rendu des cobayes tuberculeux en les nourrissant avec le lait provenant d'une vache phtisique ; les lésions de l'intestin manquent parfois chez les animaux ainsi infectés.

Lapin. — Le lapin est moins sensible que le cobaye ; il ne se tuberculise pas fatalement après l'inoculation sous-cutanée d'une petite quantité d'un produit tuberculeux ; parfois, la lésion locale dure fort longtemps avant que la généralisation ne se produise.

Inoculation sous-cutanée. — La mort survient en un ou plusieurs mois, suivant la quantité de virus inoculé ; on observe le chancre local et toutes les lésions du type Villemin.

Inoculation intrapéritonéale. — L'évolution est plus rapide : on

observe une éruption tuberculeuse sur le péritoine, la rate, le foie, etc.; la mort arrive souvent avant que les tubercules aient eu le temps d'envahir les organes thoraciques.

Inoculation intrapulmonaire. Inhalation. — Mêmes lésions et même marche que chez le cobaye. Par l'inoculation trachéale, Fraenkel et Troje ont produit chez le lapin la pneumonie caséeuse.

Inoculation dans la chambre antérieure de l'œil. — Ce mode d'inoculation permet de suivre facilement l'évolution des lésions. Au cours du troisième septénaire, l'iris se couvre de granulations tuberculeuses, puis l'œil se tuméfie, l'humeur aqueuse se trouble, parfois il se produit une fonte purulente de l'œil; les ganglions du cou s'hypertrophient et la tuberculose se généralise suivant le type Villemin.

Inoculation intraveineuse. — L'infection qui succède à ce mode d'inoculation peut affecter deux types :

a. *Granulie.* — La mort survient en deux ou trois semaines selon la dose injectée; les viscères et les séreuses sont couverts d'un semis de granulations jeunes.

b. *Type Yersin.* — La mort survient en douze à vingt-cinq jours; les animaux maigrissent et se cachectisent rapidement; la température est très élevée. A l'autopsie, on trouve comme lésion unique une hypertrophie considérable de la rate et du foie; il n'existe aucun tubercule apparent; le foie, la rate, la moelle des os contiennent en abondance le Bacille tuberculeux.

Straus et Gamaléia ont soutenu que le type Yersin était le mode d'évolution caractéristique de l'infection sanguine par le *Bacille aviaire*; mais de nombreux faits de Yersin, Nocard, Courmont et Dor, Sanchez Toledo, Cadiot, Gilbert et Roger, etc., prouvent que l'inoculation intraveineuse du Bacille humain est susceptible de produire le type Yersin. — Grancher et Ledoux-Lebard obtiennent à volonté chez le lapin le type Yersin ou la granulie selon qu'ils injectent une dose massive ou une dose minime de virus.

D'une façon générale, cependant, le Bacille aviaire injecté dans les veines du lapin ou du cobaye produit une simple infiltration tuberculeuse des organes sans formation de tubercules visibles.

Chien. — Le chien est facilement infecté par le Bacille humain; il est beaucoup plus résistant vis-à-vis du Bacille aviaire, mais ne jouit cependant pas d'une immunité complète vis-à-vis de ce bacille (Grancher et Héricourt).

Inoculation sous-cutanée.—Ce mode d'inoculation n'entraîne pas fatalement la mort; la tuberculose peut rester localisée ou se généraliser.

Inoculation intrapéritonéale. — La mort survient au bout de deux à trois mois après l'inoculation d'une culture pure dans le péritoine; il se produit une péritonite tuberculeuse avec épanchement, forma-

tion de fausses membranes, agglutination des anses intestinales, envahissement des ganglions, puis l'infection se généralise.

Inoculation intraveineuse. — La mort arrive un ou deux mois après l'inoculation, dans une veine, d'un quart de centimètre cube d'une émulsion épaisse de culture sur gélose glycérinée; les lésions pulmonaires dominent; le foie, la rate, etc., peuvent également contenir des tubercules.

Inhalation. — Tappeiner a infecté des chiens en les faisant respirer dans une atmosphère chargée de crachats tuberculeux desséchés et pulvérisés; les lésions siègent dans les poumons, la rate et les reins.

Oiseaux. — Les partisans de la dualité des tuberculoses humaine et aviaire ont soutenu que la poule n'était pas réceptive pour le Bacille humain; cette opinion ne saurait plus être admise aujourd'hui après les expériences de Koch, de Nocard et Cadiot, de Gilbert et Roger; ces expérimentateurs ont observé des tubercules chez la poule à la suite de l'ingestion ou de l'inoculation de produits tuberculeux provenant de l'homme et de cultures pures du Bacille humain.

L'injection intraveineuse du virus aviaire entraîne la mort de la poule en quinze à vingt jours avec production d'une tuberculose du type Yersin (Voy. aussi p. 526).

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Les Bacilles humain, aviaire et pisciaire présentent les mêmes caractères. Dans les cultures, le Bacille tuberculeux apparaît sous l'aspect de petits bâtonnets très fins, immobiles (?).

Ferran, dans un mémoire dont on ne peut accepter toutes les conclusions sans réserves, donne le Bacille tuberculeux comme mobile ; ce fait est confirmé par une observation d'Arloing qui, réensemençant en bouillon glycériné une culture sur pomme de terre glycérinée, obtint des bacilles mobiles ; par un procédé analogue, Schumowsky a obtenu également des bâtonnets doués de mouvements.

Dans les cultures sur milieux solides, les bacilles se groupent en amas allongés, sinueux, rappelant l'aspect de moustaches, par suite de l'enchevêtrement régulier et dans le même sens des bacilles; on rend cette disposition très visible en appuyant légèrement une lamelle à la surface d'une culture sur gélose glycérinée, puis en la retirant sans exercer de frottement; on fixe alors la lamelle par la chaleur, on colore par un des procédés indiqués ci-dessous et on

examine avec l'objectif à immersion ; la figure reproduit l'aspect de la préparation obtenue.

Le Bacille de la tuberculose, pour être vu dans les humeurs et les

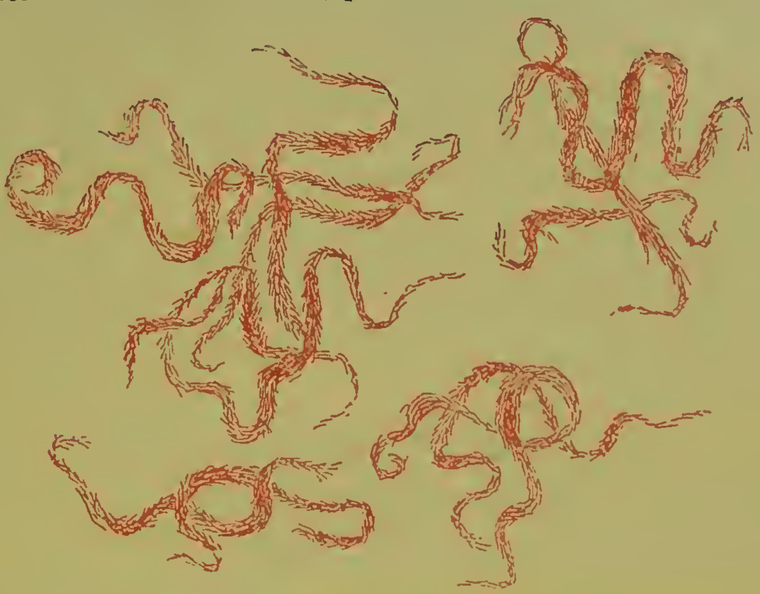


Fig. 225. — Préparation par impression de Bacille tuberculeux. 700/1 (d'après Koch).

tissus, exige une coloration préalable : nous devons apprendre à le colorer avant que d'en étudier les caractères.

COLORATION.

L'étude du Bacille de Koch exige l'emploi de méthodes spéciales de coloration, méthodes qui permettent non seulement de mettre le bacille en évidence dans les humeurs et les tissus, mais encore de le caractériser.

Le Bacille de Koch se colore difficilement par les couleurs basiques d'aniline, mais une fois qu'il est coloré, il retient énergiquement la substance colorante, même quand on l'expose à l'action de décolorants énergiques, tels que les acides minéraux dilués. Un seul bacille pathogène, le Bacille de la lèpre, partage cette propriété avec le Bacille de Koch, mais nous verrons qu'il est aisé de différencier ces deux microbes (1).

(1) En dehors du Bacille de la lèpre, quelques microbes partagent, avec le Bacille de Koch, la propriété de résister à l'action décolorante des acides dilués, quand ils ont été fortement imprégnés d'une substance colorante. Tel est le Bacille du smegma, de Tavel (prétendu Bacille de la syphilis de Lustgarten), qui se décolore par contre sous l'influence de l'alcool absolu, de l'éther, etc. — Bienstock, Gottstein ont montré que des bacilles divers (B. charbonneux, *B. subtilis*), après avoir cultivé dans du beurre à 37°, possédaient la faculté de résister aux décolorants acides, après coloration par la liqueur de Ziehl. — Obermüller, Rabinowitsch, Petri, Rubner, etc., ont signalé, dans divers milieux, et en particulier dans le beurre, des bacilles présentant les réactions colorantes du Bacille de Koch, tout en différant de ce

La réaction colorante du Bacille tuberculeux semble due à la présence d'une matière grasse ou cireuse, insoluble dans l'alcool et l'éther (Koch, Tavel, Viquerat). Borrel, en traitant les bacilles par le xylol à chaud, en a extrait une matière cireuse gardant le Ziehl ; les bacilles ainsi traités ne résistent plus aux décolorants acides.

Un grand nombre de procédés de coloration ont été proposés pour la recherche du Bacille de Koch : tous ils sont basés sur le principe que nous venons de poser.

Nous devons exposer ici les procédés dont l'usage est le plus fréquent. mais nous ne saurions trop insister sur la nécessité pour les commençants d'adopter un procédé unique, procédé qu'ils connaîtront à fond et sur les résultats duquel ils pourront compter ; toutes nos préférences vont au procédé de Ziehl-Nelsen.

I. — PROCÉDÉS APPLICABLES AUX FROTTIS.

Procédé de Ziehl-Nelsen.

Procédé recommandé.

Principe. — Étant donné un frottis coloré par la fuchsine phéniquée, si on le traite par un acide minéral dilué, le fond et tous les microbes, sauf celui de la tuberculose, se décolorent, le Bacille tuberculeux reste coloré en rouge ; si on fait alors agir sur la préparation une solution aqueuse de bleu de méthylène, le fond et les bacilles incolores se teintent en bleu, le Bacille tuberculeux restant rouge.

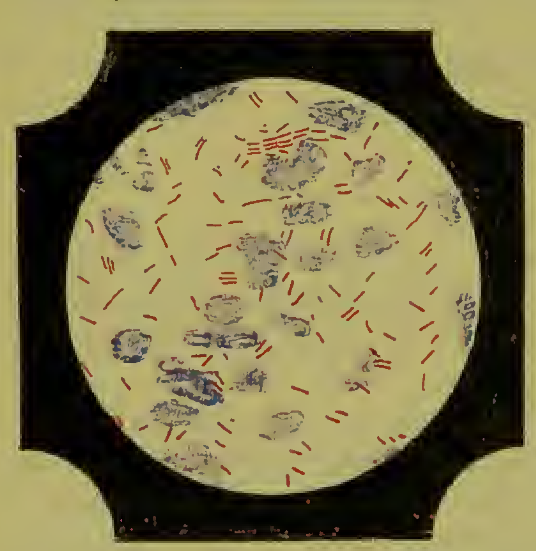


Fig. 226. — Bacille tuberculeux dans les crachats. — Méthode de Ziehl, double coloration (Reich.; Obj. 1/12 imm. ; Oc. II).

Opération. — 1° Sur la lamelle séchée et fixée comme à l'ordinaire, tenue par un de ses angles avec la pince de Cornet, on dépose une grosse goutte de fuchsine de Ziehl. On porte la lamelle sur une petite flamme (veilleuse du bec Bunsen), et on chauffe très douce-

dernier par la virulence et les caractères des cultures. Le fait que la plupart de ces bacilles, inoculés au cobaye, donnent des lésions locales, nettement tuberculeuses, mais sans tendance à la généralisation, ne permet pas, jusqu'à plus ample informé, de les rejeter catégoriquement du cadre des Bacilles tuberculeux.

ment, jusqu'à production de vapeurs, pendant environ deux minutes, en évitant d'atteindre l'ébullition et en veillant à ce que la solution colorante ne se dessèche pas sur la lamelle.

2° Rejeter la solution colorante et la remplacer par quelques gouttes d'acide azotique au tiers (eau distillée, 2 volumes; acide azotique pur, 1 volume) ou d'acide sulfurique au quart (eau distillée, 3 volumes; acide sulfurique pur, 1 volume). Laisser en contact quelques secondes; la préparation devient jaunâtre.

3° Laver alors à grande eau, une légère teinte rose reparaît. La lamelle doit être colorée en rose pâle; si la décoloration n'était pas suffisante, on ferait alors agir de nouveau la solution acide.

4° Après le lavage à l'eau, verser sur la préparation quelques gouttes d'alcool absolu, pour achever la décoloration; après action de l'alcool, la teinte rose doit être faible, à peine visible.

Ce temps permet de pousser très loin la décoloration, sans avoir à redouter l'action trop énergique de l'acide qui, à la longue, décolorerait même les Bacilles tuberculeux; de plus, l'action de l'alcool permet d'éliminer le *Bacille du smegma* qui se décolore dans les mêmes conditions.

5° Laver à grande eau, puis déposer sur la préparation un peu de solution aqueuse de bleu de méthylène; laisser quelques instants en contact.

6° Laver à l'eau ; sécher ; monter dans le baume.

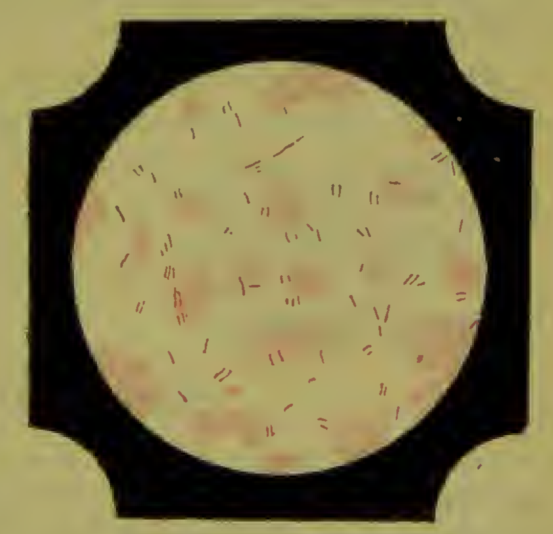


Fig. 227. — Bacille tuberculeux dans les crachats. — Méthode de Ziehl; simple coloration (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Remarque. — Quand on fait simplement la recherche du Bacille tuberculeux, il y a grand avantage à ne pas recolorer le fond après l'action de l'alcool : les bacilles apparaissant en rouge foncé sur le fond incolore ou à peine rose sont beaucoup plus visibles.

On arrête l'opération au temps 4 inclus; après lavage, la préparation est examinée dans l'eau; si, après examen, on la juge bonne à conserver, on peut la soumettre à l'action du bleu de méthylène et terminer comme il est dit plus haut.

Cette simplification est surtout utile quand les bacilles sont peu nombreux dans la préparation; les débutants tireront un grand profit de son emploi; en tous cas, elle rend la recherche plus rapide.

Procédé de Gabbé.

Le procédé de Gabbé n'est qu'une modification de celui de Ziehl, mais est moins sûr et plus délicat à exécuter que ce dernier.

1° Colorer à la fuchsine phéniquée comme plus haut.

2° Opérer à la fois la décoloration et la recoloration du fond en plongeant la lamelle pendant une minute dans la solution suivante :

Bleu de méthylène	2 grammes.
Acide sulfurique au quart	100 centimètres cubes.

3° Laver, sécher, monter.

Les procédés de Stocquart et de Pithion et G. Roux (de Lyon) sont des modifications sans intérêt du procédé de Gabbé.

Procédé d'Ehrlich.

1° Colorer la lamelle à chaud pendant cinq minutes avec le violet aniliné (p. 140).

Pour cela on dépose une goutte de matière colorante sur la lamelle et on chauffe sur la veilleuse à gaz; on peut aussi plonger la lamelle dans une petite capsule contenant la solution et chauffer jusqu'à production de vapeurs.

2° Décolorer pendant quelques secondes à l'acide nitrique au tiers.

3° Laver; achever la décoloration à l'alcool absolu.

4° Colorer pendant quelques instants à froid dans une solution aqueuse saturée de vésuvine.

5° Laver, sécher, monter.

Les Bacilles tuberculeux sont colorés en violet, le fond est teinté en brun par la vésuvine.

Procédé de Fraenkel.

1° Colorer les lamelles à chaud pendant cinq minutes avec la fuchsine anilinée (préparée comme le violet aniliné en remplaçant la solution alcoolique de violet de gentiane par la même solution de fuchsine).

2° Au sortir de la fuchsine anilinée, placer les lamelles pendant une minute dans la solution suivante :

Alcool à 90°	50 centimètres cubes.
Eau d'aniline	30 —
Acide azotique pur	20 —
Solution alcoolique saturée de bleu de méthylène	Q. S. pour obtenir une teinte bleu intense.

3° Laver à l'eau distillée; sécher et monter.

Procédé d'Herman.

Préparer les solutions suivantes :

A	Krystall violet	1 gramme.
	Alcool à 90°	30 centimètres cubes.
B	Carbonate d'ammoniaque	1 gramme.
	Eau distillée	100 centimètres cubes.

Au moment du besoin, verser dans une petite capsule quelques centimètres cubes de solution B, y ajouter de la solution A en quantité suffisante pour qu'une goutte du mélange déposée sur du papier à filtrer y laisse une teinte très foncée.

1° Chauffer le bain colorant jusqu'à ébullition commençante et y plonger les lamelles pendant une minute.

2° Porter les lamelles pendant quatre à cinq secondes dans une solution d'acide nitrique au dixième.

3° Laver à l'alcool absolu pour achever la décoloration.

4° Porter les lamelles pendant trente secondes dans la solution suivante :

Éosine	1 gramme.
Alcool à 60°	100 centimètres cubes.

5° Laver très rapidement à l'alcool ; sécher, monter.

Les Bacilles tuberculeux sont colorés en violet ; le fond est teinté par l'éosine.

Procédé de Lustgarten modifié.

En modifiant légèrement la méthode indiquée par Lustgarten pour la coloration du prétendu Bacille de la syphilis, Sabouraud a obtenu un procédé qu'il déclare être d'une extrême sensibilité pour la recherche du Bacille tuberculeux. On opère comme il suit :

1° Colorer la lamelle à froid pendant une à deux heures, ou à 50° pendant quinze minutes avec le liquide de Ziehl.

2° Faire agir sur la lamelle pendant une à trois secondes une solution de permanganate de potasse à 1,5 p. 100.

3° Plonger immédiatement la lamelle dans une solution aqueuse fraîche et saturée d'acide sulfureux, pendant quelques secondes, jusqu'à décoloration.

On obtient aisément la solution d'acide sulfureux, au moment du besoin, en faisant barboter dans l'eau distillée le gaz qui se dégage d'un siphon d'acide sulfureux liquéfié, tel qu'on en trouve dans le commerce.

4° Laver à l'eau, puis colorer le fond pendant une à trois minutes avec la solution aqueuse de bleu de méthylène.

5° Laver à l'eau ; sécher, monter dans le baume.

Procédé de Koch.

Ce procédé, le premier employé pour la recherche du Bacille tuberculeux, a surtout un intérêt historique.

1° Placer les lamelles pendant un jour à la température ordinaire, ou pendant quelques heures à 45° ou 50° dans le bain suivant :

Solution alcoolique saturée de bleu de méthylène..	1 centimètre cube.	
Solution aqueuse de potasse à 10 p. 100..........	2 centimètres cubes.	
Eau distillée....................................	200	—

2° Plonger les lamelles dans une solution aqueuse saturée de vésuvine; au bout d'un quart d'heure environ, une teinte brune se substitue à la coloration bleue primitive, sauf en ce qui concerne les Bacilles tuberculeux qui conservent leur teinte bleue.

II. — PROCÉDÉS APPLICABLES AUX COUPES.

Les méthodes que nous venons d'indiquer s'appliquent, après de légères modifications, à la coloration des coupes; la particularité capitale est que *la coloration doit toujours être faite à froid.*

Procédé de Ziehl-Nelsen.

Procédé recommandé.

1° Colorer la coupe par un séjour d'un quart d'heure dans la fuchsine de Ziehl, à froid.

2° Faire agir pendant quelques secondes la solution acide: laver.

3° Achever la décoloration par l'alcool absolu jusqu'à ce que la coupe n'ait plus qu'une teinte rose pâle. Laver.

4° Colorer le fond avec la solution aqueuse de bleu de méthylène.

5° Laver, puis faire agir rapidement l'alcool absolu, l'essence de girofle et le xylol; monter dans le baume.

Procédé de Kühne.

Procédé recommandé.

Ce procédé inédit de Kühne a été rapporté par Borrel; il réussit en particulier pour la coloration des coupes du poumon. L'action du chlorhydrate d'aniline est moins brutale que celle des acides minéraux et n'altère pas la disposition et la forme des cellules.

1° Faire agir sur la coupe l'hématoxyline de Bœhmer ou l'hématéine (p. 227) pendant deux minutes, pour colorer les noyaux des cellules. Laver à l'eau distillée.

2° Colorer quinze minutes à froid dans la fuchsine de Ziehl.

3° Faire agir sur la coupe, pendant quelques secondes, une solution aqueuse à 2 p. 100 de chlorhydrate d'aniline.

4° Décolorer à l'alcool absolu.

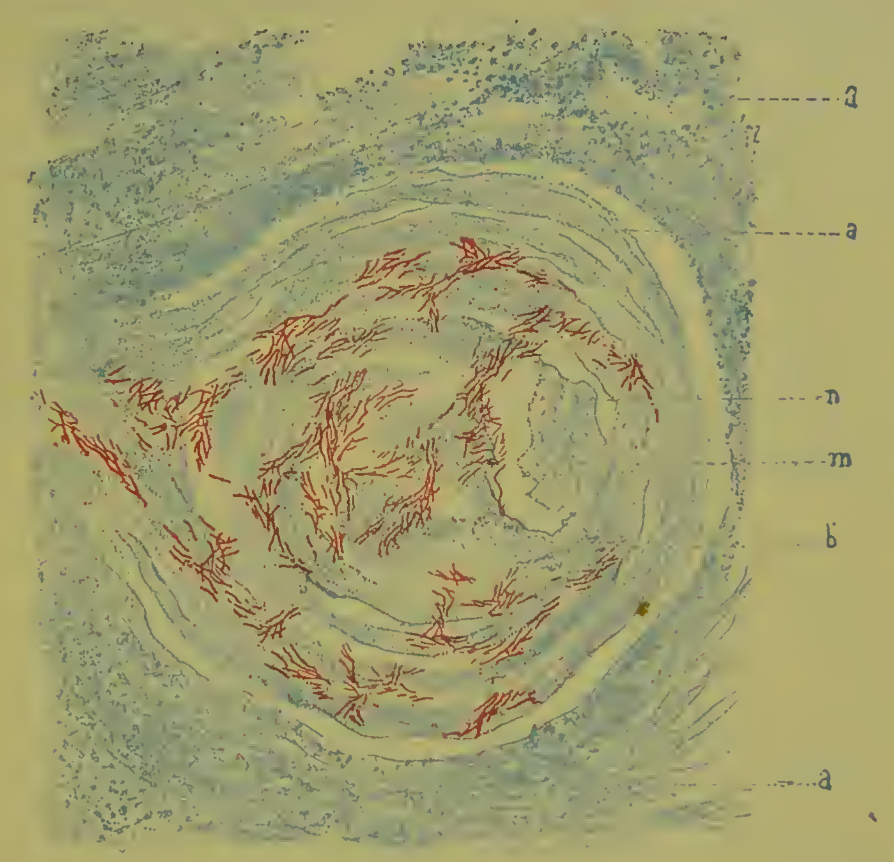


Fig. 228. — Tubercule fibreux du poumon. — Méthode de Ziehl-Nelsen.

Après cette décoloration, les cellules du fond sont incolores (sauf les noyaux); on peut faire agir la solution aqueuse de jaune-aurantia qui colore en particulier les globules sanguins; après l'action de l'aurantia, on déshydrate par l'alcool absolu.

5° Éclaircir par l'essence de girofle, le xylol et monter dans le baume.

Procédé d'Ehrlich.

1° Colorer à froid pendant douze heures dans le violet aniliné.

2° Décolorer pendant quelques secondes avec l'acide nitrique au tiers. Laver.

3° Achever la décoloration à l'alcool absolu.

4° Faire agir pendant quelques minutes une solution aqueuse saturée de vésuvine.

5° Déshydrater rapidement à l'alcool absolu ; éclaircir par l'essence de girofle et le xylol. Monter dans le baume.

Procédé de Letulle.

1° Colorer les noyaux à l'hématoxyline, comme dans le procédé de Kühne. Laver à l'eau distillée.

2° Faire agir pendant quinze minutes la fuchsine de Ziehl à froid. Laver rapidement à l'eau distillée.

3° Laver pendant trente secondes à l'alcool absolu.

4° Faire agir pendant cinq minutes la solution suivante :

Vert d'iode....................................	1 gramme.
Eau phéniquée à 2 p. 100........................	100 centimètres cubes.

5° Décolorer à l'alcool absolu.

6° Éclaircir à l'essence de girofle, au xylol. Monter dans le baume.

Le fond est teint en gris lilas très faible, les noyaux sont colorés en violet, les bacilles en rouge foncé. Cette méthode est applicable aux pièces durcies dans le liquide de Müller.

Procédé de Lustgarten modifié.

1° Colorer à froid pendant quelques heures dans la fuchsine phéniquée.

2°, 3°, 4°, 5° Opérer comme il a été dit à propos des lamelles (p. 537).

6° Laver à l'eau ; déshydrater rapidement à l'alcool absolu.

7° Éclaircir à l'essence de girofle, au xylol et monter dans le baume.

Cette méthode est utilisable pour la recherche, souvent délicate, des bacilles dans le foie ; elle est applicable aux pièces durcies par le liquide de Müller.

ASPECT DU BACILLE APRÈS COLORATION.

Dans les préparations colorées, les Bacilles tuberculeux ont une longueur variant entre 2 et 5 μ, et une largeur de 0,3 et 0,5 μ ; leur diamètre transversal est d'ordinaire uniforme sur toute leur longueur ; tantôt ils semblent homogènes, tantôt, au contraire, ils sont parsemés d'espaces clairs qui les font paraître composés d'une série de petits grains ovoïdes ou arrondis. Ils sont quelquefois droits, mais, plus souvent, ils présentent une légère inflexion en S ou sont recourbés à une de leurs extrémités.

Dans les crachats et les tissus tuberculeux, les bacilles sont isolés ou réunis par groupes dont les éléments peuvent être parallèles ; parfois deux bacilles se croisent à angle plus ou moins aigu ou sont réunis à angle par une de leurs extrémités.

Koch décrivait comme des spores les espaces clairs que présentent

quelquefois les bacilles; aujourd'hui, on tend plutôt à considérer comme des spores les granulations fortement colorées qui siègent à l'extrémité ou dans la continuité de certains bacilles (Babès, Ehrlich).

Dans les cultures, on trouve parfois des bacilles excessivement courts; dans d'autres cas, et particulièrement dans les cultures âgées, on rencontre des bacilles volumineux ramifiés, souvent terminés par un renflement en massue (fig. 229); ces formes géantes permettent de rapprocher le Bacille de Koch des *Streptothricées*.



Fig. 229. — Bacilles de la tuberculose; formes anormales ramifiées et renflées (d'après Metchnikoff).

§ 2. — CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Bacille de Koch cultive sur un nombre limité de milieux : milieux à base de sérum (Koch) ou de glycérine (Nocard et Roux), à l'exclusion des milieux ordinaires. Il est aérobie et ne cultive qu'à partir de + 30°; la culture s'arrête à 41° pour le Bacille humain et seulement à 44°-45° pour le Bacille aviaire. La température eugénésique est de 37°-38°.

L'*ensemencement* du Bacille de la tuberculose exige certaines précautions. On emprunte de préférence la semence à de la matière tuberculeuse provenant d'un cobaye ou d'un lapin (le bacille prélevé directement chez l'homme pousse mal sur les milieux artificiels). Le produit tuberculeux doit, au préalable, être broyé soigneusement dans un verre stérile avec un agitateur également stérile, puis, avec l'öse forte, on en porte une certaine quantité à la surface du sérum solidifié (il est préférable d'utiliser le sérum additionné avant solidification de 4 p. 100 de glycérine).

En ensemençant, il ne faut pas craindre d'écorcher légèrement avec l'öse la surface du milieu de culture; il est nécessaire d'opérer sur un grand nombre de tubes, beaucoup de ceux-ci restant stériles. Le développement ne commence que vers le douzième jour d'exposition à 37°-38°; la culture n'est achevée que vers la fin de la qua-

trième semaine. Dès que les colonies apparaissent, il faut placer sur l'orifice de chaque tube un capuchon de caoutchouc pour éviter la dessiccation du milieu de culture.

Les cultures ainsi obtenues fournissent les matériaux pour l'ensemencement sur les divers milieux ; toujours, il faut avoir soin de prendre beaucoup de semence et d'ensemencer plusieurs tubes.

Sérum solidifié. — *Bacille humain.* — Le long de la strie, apparaît vers le douzième jour à 37°-38°, un semis de petites colonies blanches, arrondies, d'aspect sec, écailleux ; puis ces colonies deviennent saillantes, leurs bords sont irréguliers, l'aspect écailleux persiste. En général, et particulièrement dans les premières cultures, les colonies ne deviennent pas confluentes ; au bout de trois à quatre passages cependant, elles peuvent se réunir en une membrane sèche et rugueuse.



Fig. 230. — Bacille de la tuberculose humaine. — Culture âgée de trois semaines sur gélose glycérinée.

Bacille aviaire. — Le Bacille aviaire donne sur sérum une couche plus abondante que le Bacille humain ; la culture est épaisse et a d'ordinaire un aspect humide et gras.

Gélose glycérinée. — C'est le milieu le plus favorable à la culture du Bacille de Koch, sauf pour la première culture qu'il est préférable de faire sur sérum glycériné. Il y a avantage à ajouter un peu de glucose à la gélose glycérinée (p. 44).

Bacille humain. — La culture débute comme sur le sérum, mais les colonies sont plus nombreuses, plus volumineuses ; elles deviennent rapidement confluentes et forment une nappe épaisse, blanchâtre, sèche, rude, écailleuse, mamelonnée, lors des premières cultures ; mais au bout de quelques passages sur gélose glycérinée, les cultures deviennent très abondantes, humides, grasses et plissées. Les cultures de tuberculose prennent en vieillissant une teinte rosée ; elles dégagent une odeur suave caractéristique.

Bacille aviaire. — On a voulu opposer la culture sur gélose du Bacille aviaire à celle du Bacille humain : le Bacille humain donne, disait-on, une culture sèche et rugueuse, le Bacille aviaire une culture humide et grasse ; nous venons de voir que le Bacille humain donne fréquemment des cultures abondantes, humides et grasses ;

de son côté le Bacille aviaire produit parfois un enduit écailleux et sec (Nocard, Grancher, Fischel).

Bouillon glycériné. — Le bouillon glycériné ou mieux glucosé-glycériné est un milieu très favorable à la culture du Bacille tuberculeux. On pratiquera les ensemencements avec les précautions suivantes : prélever avec l'öse des parcelles de cultures développées sur un milieu solide, et, de préférence, au niveau de la goutte de liquide qui se trouve au fond des tubes de gélose glycérinée ; déposer ces fragments avec précaution de manière à les faire flotter à la surface du bouillon contenu dans de petits matras.

La culture se produit d'ordinaire en voile : dès le quinzième jour une auréole blanchâtre apparaît autour des fragments ensemencés; cette auréole s'étend et forme un voile mince qui recouvre toute la surface du bouillon. Ce voile, d'abord sec et fragile, s'épaissit; tantôt il reste sec, écailleux, tantôt il devient gras, plissé, humide ; il grimpe fréquemment le long des parois du matras, sur une hauteur qui peut atteindre un centimètre. Rarement, le voile manque et la culture se fait sous forme d'un sédiment floconneux. Dans tous les cas le bouillon reste clair.

Bouillon de poisson glycériné. — Ce milieu a été recommandé par Martin, il se prépare de la façon suivante :

Hacher de la chair de hareng, y ajouter une fois et demie son poids d'eau, chauffer lentement et maintenir l'ébullition pendant trois quarts d'heure. Filtrer à chaud plusieurs fois sur papier Chardin; le bouillon obtenu doit être clair, y ajouter 6 p. 100 de glycérine et s'assurer qu'il est neutre. Répartir et stériliser à l'autoclave.

Les caractères de la culture sont les mêmes qu'en bouillon ordinaire glycériné.

Pomme de terre. — Le Bacille de la tuberculose pousse sur pomme de terre; pour obtenir de belles cultures il faut glycériner les pommes de terre suivant le procédé de Nocard :

La pomme de terre étant découpée en fragments, placer ceux-ci dans un cristallisoir et les couvrir d'eau additionnée de 15 p. 100 de glycérine; laisser en contact deux jours à la glacière, puis placer les fragments dans des tubes de Roux et stériliser comme d'ordinaire.

Sur ce milieu, la culture apparaît vers le douzième jour; elle forme d'ordinaire un voile épais, plissé, mou, rarement sec et rugueux. Souvent la culture gagne le liquide qui s'est égoutté dans la partie inférieure du tube et elle y forme un voile : ce voile est excellent pour pratiquer les ensemencements en milieux liquides.

Article III. — RECHERCHE DU BACILLE DE KOCH.

La recherche du Bacille tuberculeux varie, quant aux détails, avec les différents tissus ou exsudats, mais dans tous les cas on dispose de deux méthodes d'investigation :

1° **Examen microscopique.** — Les humeurs, tissus, etc., sont soumis à la coloration par les procédés de Ziehl ou d'Ehrlich : les Bacilles tuberculeux seuls restent colorés ; en réalité deux autres microbes pourraient être confondus avec le Bacille de Koch, ce sont le Bacille de la lèpre et le Bacille du smegma. Pour le premier, nous apprendrons à le différencier au chapitre suivant. Pour le Bacille du smegma, l'erreur n'est guère à redouter, étant donné le siège spécial de cette bactérie ; en outre, le Bacille du smegma, qui résiste comme le Bacille tuberculeux à l'action des acides minéraux, se décolore rapidement quand on le soumet à l'action de l'alcool (probablement parce que l'alcool dissout les matières grasses qui l'imprègnent) ; en employant le procédé de Ziehl-Nelsen tel que nous l'avons décrit, on est à l'abri de toute confusion.

On prépare les frottis selon les méthodes ordinaires : les tissus à couper sont de préférence durcis par l'alcool absolu, le sublimé acide, ou le Flemming (Voy. p. 210).

2° **Inoculations.** — L'inoculation tranche en dernier ressort dans les cas fréquents où l'examen microscopique demeure négatif. On s'adresse toujours au cobaye, animal le plus réceptif. Quand il s'agit d'un produit pur (tel que : tubercule recueilli aseptiquement, pus, sérosité pleurale ou ascitique), l'inoculation peut être pratiquée dans le péritoine ; mais quand le produit a été exposé à une cause de souillure (crachats, pus s'écoulant par une fistule, etc.), l'inoculation doit être faite sous la peau, l'inoculation intrapéritonéale entraînant dans ce cas la production d'une péritonite banale qui emporte l'animal avant le développement de l'infection tuberculeuse.

CRACHATS.

1° **Examen microscopique.** — La recherche du Bacille tuberculeux dans les crachats est aisée quand ceux-ci sont nettement purulents et que les bacilles y fourmillent ; elle est beaucoup plus délicate et reste souvent infructueuse quand les crachats sont rares, muqueux, et proviennent des lésions de début du processus tuberculeux, ou encore quand on a affaire à des crachats presque uniquement constitués par du sang, comme cela se produit dans les hémo-

ptysies. En règle, on recherchera toujours le Bacille tuberculeux dans les crachats expectorés le matin.

Pour les crachats nummulaires, il suffit de prélever avec l'öse un petit fragment au centre de la masse purulente et de l'étaler sur une lamelle par le procédé ordinaire. On choisit de préférence dans les crachats les grumeaux jaunâtres qui sont très riches en bacilles ; de même, pour les crachats muqueux, on prélève autant que possible les portions solides nageant dans le liquide.

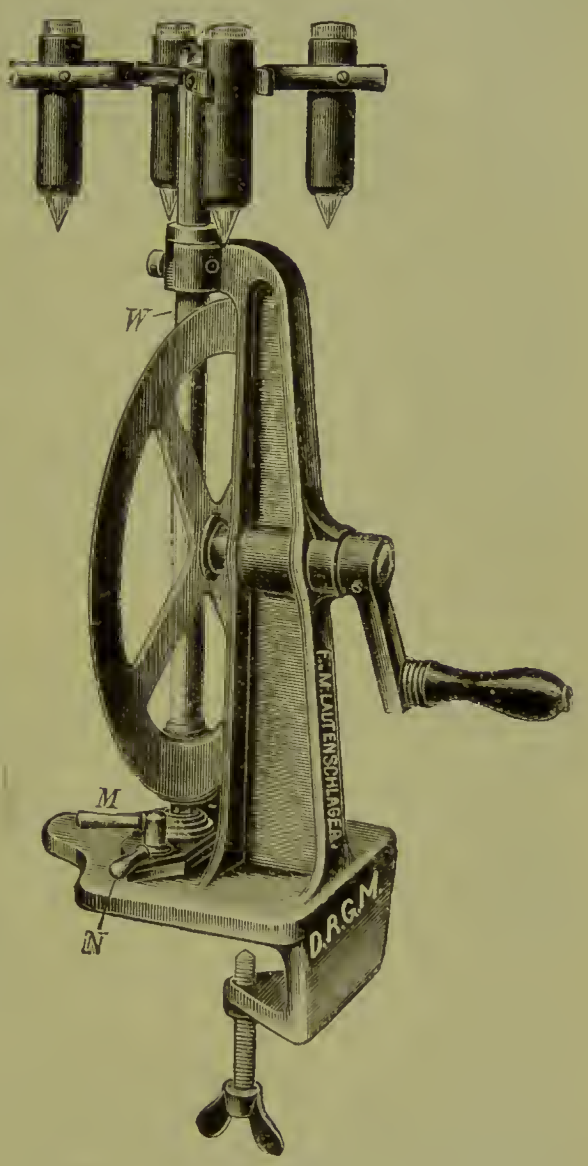


Fig. 231. — Appareil pour la centrifugation des liquides.

Le Bacille de la tuberculose est très difficile à déceler dans le sang des hémoptysies ; on le rencontre plus aisément dans les crachats concrets, striés de sang, que les malades expectorent dans les jours qui suivent l'hémorragie.

Il est très rare de rencontrer des bacilles dans les crachats des malades atteints de granulie, les bacilles ne passant dans les crachats qu'au moment de la fonte purulente des lésions tuberculeuses.

Homogénisation.—Quand les crachats contiennent peu de bacilles, on a recours à un artifice pour mettre ceux-ci en évidence : on liquéfie et rend homogènes les crachats, puis on les abandonne au repos, ou on les soumet à la *centrifugation* ; le dépôt obtenu contient, sous un petit volume, tous les bacilles qui étaient disséminés dans la masse visqueuse, il est dès lors facile de colorer ces bacilles.

Procédé de Biedert. — A 15 ou 20 centimètres cubes de crachats on ajoute 30 à 40 centimètres cubes d'eau, puis quelques gouttes (6 à 15) de

lessive de soude : ajouter d'autant plus de lessive de soude que les crachats sont plus épais, plus visqueux. On fait bouillir le mélange dans une capsule de porcelaine jusqu'à ce qu'il soit devenu bien homogène, puis on y ajoute un ou deux volumes d'eau et on porte de nouveau à ébullition pendant quelques instants. On abandonne alors le tout au repos dans un verre conique, pendant quarante-huit heures, puis on décante et on prépare des lamelles avec le dépôt.

Procédé d'Ilkewitsch. — Mélanger un demi-centimètre cube de crachats, 20 centimètres cubes d'eau distillée et environ 10 gouttes de solution de potasse caustique à 1 p. 30; chauffer, dans une capsule de porcelaine, sans atteindre l'ébullition et en remuant constamment jusqu'à ce que le mélange soit homogène; ajouter alors un peu de caséine et une goutte ou deux de solution de potasse à 1 p. 30 et continuer à chauffer jusqu'à ce que le liquide ait pris l'apparence du lait ; verser dans un verre à expérience, ajouter quelques gouttes d'acide acétique jusqu'à commencement de coagulation ; centrifuger pendant quelques minutes et préparer des lamelles avec le dépôt.

Procédé de Sprengler. — Mélanger 10 centimètres cubes de crachats, 10 centimètres cubes d'eau tiède et une goutte de solution normale de soude, ajouter 0gr,25 à 0gr,50 de pancréatine et placer le tout à l'étuve à 37° ; au bout de deux à trois heures, verser dans un verre conique, ajouter un cristal de thymol pour empêcher la putréfaction et laisser déposer pendant douze à quatorze heures; décanter alors et préparer des lamelles avec le sédiment.

Les lamelles préparées avec les crachats ou les dépôts de crachats homogénisés sont colorées par un des procédés que nous avons indiqués ; le procédé de Ziehl-Nelsen est le plus recommandable.

2° **Inoculations**. — Quand, après un examen microscopique négatif, il reste des doutes sur la nature des crachats, on doit pratiquer l'inoculation. Un crachat recueilli purement (Voy. p. 191) est broyé avec un peu d'eau stérile et l'émulsion obtenue est injectée sous la peau d'un cobaye; si le crachat est tuberculeux, l'animal ne tarde pas à présenter les symptômes de la tuberculose (Voy. p. 529); les crachats ne doivent jamais être injectés dans le péritoine, car ils détermineraient le plus fréquemment une péritonite aiguë banale.

3° **Cultures**. — L'ensemencement des crachats ne peut être d'aucune utilité pour le diagnostic de la tuberculose. Longtemps on a considéré comme impossible d'obtenir des cultures de Bacille de Koch en partant des crachats ; Kitasato et Pastor ont décrit des procédés permettant de pratiquer des ensemencements fertiles.

Procédé de Kitasato. — Faire laver la bouche du malade à l'eau stérile, provoquer la toux et recevoir le crachat dans un verre flambé ; laver le crachat dans une dizaine de verres contenant de l'eau stérile (Voy. p. 530), puis prélever purement un petit fragment au centre de la masse purulente et l'étendre sur du sérum glycériné; ensemencer un grand nombre de tubes. La culture se développe au bout de dix à douze jours à 38°.

Procédé de Pastor. — Faire laver la bouche du malade à l'eau stérile, provoquer la toux et recevoir le crachat dans un verre stérile; émulsionner le crachat dans un peu d'eau stérile, puis filtrer l'émulsion sur un morceau de gaze préalablement bouilli. Ensemencer un tube de gélatine liquéfiée avec quelques gouttes du liquide obtenu, couler le tout dans une boîte de Petri et laisser solidifier. Au bout de trois à quatre jours d'exposition à 20°, les microbes d'impureté se sont développés et forment de nombreuses colonies; entre ces colonies on détache, avec un scalpel flambé, des portions de gélatine restées stériles et on les transporte sur des tubes de sérum glycériné; en ensemençant ainsi de nombreux tubes, on obtient sur quelques-uns une culture pure de Bacille de Koch.

SANG.

Le Bacille de Koch passe parfois dans le sang des malades atteints de granulie, mais on l'y décèle difficilement; Lustig, Benda, Rutimeyer, Sticker, etc., ont réussi à le colorer dans des lamelles préparées avec le sang obtenu par piqûre du doigt ou de la rate; il est plus aisé de le mettre en évidence dans les caillots formés après la mort dans le cœur ou les vaisseaux. On emploie pour cette recherche le procédé de coloration de Ziehl-Nelsen.

PUS.

Le pus tuberculeux contient peu de bacilles, aussi la recherche dans les lamelles colorées est-elle souvent infructueuse. On utilisera avec avantage pour cette recherche un des procédés d'homogénisation que nous avons indiqués à propos des crachats. Il sera toujours préférable de pratiquer une inoculation au cobaye. Le Bacille de Koch existe le plus souvent à l'état pur dans le pus tuberculeux, mais il peut y être associé aux microbes ordinaires de la suppuration et particulièrement aux Staphylocoques.

SÉROSITÉS.

Dans les liquides séro-fibrineux de la pleurésie, de la péritonite, de la péricardite, etc., il faut renoncer à rechercher le Bacille de Koch par l'examen microscopique : l'insuccès de ce mode d'investigation est constant.

Le procédé classique de recherche consiste à inoculer au cobaye le liquide suspect; encore faut-il savoir que l'inoculation de la sérosité des pleurésies tuberculeuses reste sans succès dans les trois quarts des cas (Kelsch et Vaillard, Netter). L'inoculation se fera de préférence dans le péritoine, on injectera une grande quantité (10 à 15 centimètres cubes) du liquide recueilli purement.

Procédé de Debove et Renault. — Debove et Renault ont imaginé un pro-

cédé fort ingénieux pour reconnaître la nature tuberculeuse d'un épanchement; ils ont montré que les sérosités pleurétique, péricardique, etc., de nature tuberculeuse contiennent de la tuberculine : en inoculant un peu de ces sérosités à un cobaye tuberculeux on obtient la réaction caractéristique de la tuberculine (Voy. p. 553).

FONGOSITÉS.

L'examen microscopique échoue le plus souvent à y déceler la présence du Bacille de Koch : on aura recours à l'inoculation d'une parcelle de la fongosité sous la peau d'un cobaye.

CAVITÉS NASALES.

Straus a montré que le Bacille tuberculeux se rencontre fréquemment (1 fois sur 3) dans les fosses nasales des individus sains vivant dans un milieu où se trouvent des phtisiques. Straus a utilisé pour ses recherches la technique suivante :

Préparer de petits écouvillons constitués par de minces baguettes de bois longues de 10 à 15 centimètres et à une extrémité desquelles on enroule un peu d'ouate hydrophile; ces écouvillons, disposés dans un tube bouché à l'ouate, sont stérilisés au four de Pasteur. Pour opérer le prélèvement, on fait pénétrer un écouvillon dans la cavité nasale et on l'y promène en frottant légèrement de manière à recueillir les poussières et mucosités qui tapissent les parois. On porte ensuite le tampon de l'écouvillon dans un peu d'eau stérile et on l'y lave avec soin; on recommence six à huit fois la même manœuvre pour un seul nez et les différents tampons sont lavés dans la même eau; on injecte cette eau dans le péritoine d'un cobaye.

URINE.

La recherche microscopique du Bacille de Koch dans l'urine des malades atteints de tuberculose des voies urinaires donne souvent des résultats négatifs : c'est à peine si l'on rencontre le bacille dans un quart des cas en examinant le dépôt obtenu par centrifugation.

L'urine est versée dans un grand verre à expérience et on y ajoute un fragment de thymol ou de camphre; s'il se produit un dépôt purulent abondant, on le soumet à l'homogénisation et à la centrifugation; si le dépôt est constitué par quelques grumeaux, on décante et on prépare des lamelles avec ces grumeaux. Quand, après vingt-quatre heures, l'urine n'a abandonné qu'un dépôt minime, on décante la partie supérieure du liquide, on ajoute aux quelques centimètres cubes qui restent dans le verre leur volume d'alcool à 95° et on soumet le mélange à la centrifugation.

Quand l'urine peut être recueillie purement (Voy. p. 35) et qu'elle n'est souillée ni par le *Bacterium coli* ni par les microbes pyogènes, on

peut en injecter quelques centimètres cubes dans le péritoine d'un cobaye ; c'est là un excellent mode de recherche.

LAIT.

Les Bacilles tuberculeux ne se trouvent qu'en petit nombre dans le lait, aussi a-t-on peu de chances de les déceler par l'examen microscopique ; plusieurs procédés ont été préconisés :

a. Laisser déposer le lait frais pendant vingt-quatre heures et rechercher le bacille dans le sédiment.

b. Centrifuger et rechercher le bacille dans le dépôt obtenu.

c. Coaguler 20 centilitres de lait en y ajoutant un peu d'acide citrique en poudre ; filtrer ; dissoudre le précipité sur le filtre dans une solution de phosphate de soude ; placer le liquide obtenu dans un gros tube à essai, y verser quelques centimètres cubes d'éther, agiter pendant une dizaine de minutes ; décanter l'éther chargé de beurre et soumettre le liquide aqueux à la centrifugation ; examiner le dépôt.

Mais l'inoculation, dans le péritoine du cobaye, de quelques centimètres cubes de lait recueilli purement est le seul procédé sur lequel on puisse compter.

Article IV. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — VITALITÉ ET VIRULENCE.

Pour rechercher la vitalité d'un produit tuberculeux, il faut pratiquer des inoculations avec ce produit, et non l'ensemencer.

Dans les cultures, le Bacille tuberculeux est peu résistant aux agents de destruction, ce qui permet d'admettre qu'il n'y forme pas de spores. Une exposition de dix minutes à 70° ou 75° suffit pour stériliser les cultures en milieux liquides. Dans les crachats humides le bacille résiste à 75°, mais est tué en cinq minutes à 100°.

Le Bacille tuberculeux résiste mieux quand il est desséché à la température ordinaire dans des cultures ou des crachats, il peut alors conserver sa virulence pendant plusieurs mois (Galtier) ; dans ces conditions il n'est pas détruit par une exposition de deux à trois heures à une température sèche de 100° et résiste plus de sept heures à 70° (Welch, Grancher, Ledoux-Lebard).

Candler, Koch, Migneco et Ransonne ont montré que l'action combinée de la dessiccation et de la lumière solaire atténue la virulence du bacille quand l'influence de la lumière se prolonge pendant plus de deux heures, mais ne parvient pas à faire disparaître sa vitalité, même après plusieurs jours.

Zilgen mélange des poussières avec des crachats tuberculeux desséchés et expose le tout au soleil : la virulence persiste dans ces conditions pendant environ cent quarante jours. D'après De Toma la virulence des crachats abandonnés dans une chambre de malades disparaîtrait après deux mois et demi et se conserverait indéfiniment quand les crachats sont en même temps placés à l'obscurité.

Malassez et Vignal ont vu que la virulence de crachats tuberculeux exposés à l'action alternante de l'humidité et de la dessiccation se conserve pendant plusieurs mois.

Les cultures du Bacille de Koch sur gélose perdent leur virulence après quelques mois.

Dans l'eau, le Bacille tuberculeux paraît conserver longtemps sa vitalité; on le retrouve après immersion de soixante-dix jours dans l'eau stérile (Chantemesse et Widal) et de cent cinquante jours dans l'eau courante (Cadéac et Malet).

La putréfaction a peu d'action sur le Bacille de Koch : des organes tuberculeux abandonnés pendant vingt et quarante jours à la putréfaction dans l'eau ont conservé leur virulence (Galtier); des poumons tuberculeux enterrés pendant cent soixante-sept jours ont été retrouvés virulents (Cadéac et Malet). Schottelius a vu le Bacille de Koch conserver sa virulence après un séjour de deux ans dans la terre, Gærtner a fait la même constatation après un séjour d'un hiver.

Action des antiseptiques. — Dans les cultures, le Bacille tuberculeux est assez sensible à l'action des antiseptiques. D'après Yersin, les bacilles sont tués par un séjour de trente secondes dans l'eau phéniquée à 5 p. 100, de cinq minutes dans l'alcool absolu et dans l'éther iodoformé à 1 p. 100, de dix minutes dans le sublimé à 1 p. 1 000, de plusieurs heures dans le thymol à 3 p. 1 000 et dans l'acide salicylique à 2,5 p. 1 000; ils résistent plus de douze heures dans l'acide borique à 4 p. 100.

D'après Koch, les substances suivantes entravent aisément le développement des cultures : huiles essentielles, naphtol β, fuchsine, bleu de méthylène, violet de gentiane et surtout cyanures d'or et d'argent; le cyanure d'or arrête la multiplication du bacille à la dose de 1/2 000 000e.

Mais, dans les sucs et organes tuberculeux, la résistance du bacille est beaucoup plus grande : l'acide salicylique à 1 p. 500, le brome à 1 p. 1 000, la créosote, la quinine, le sublimé à 1 p. 1 000 sont sans action. A 6 p. 100 l'acide phénique a un effet douteux, l'acide fluorhydrique n'a guère d'action à 1 p. 4 000, solution très caustique (H. Martin). Les nombreuses expériences de Vallin, Mairet, Cavalier, Coze et Siamon, etc., ont donné des résultats contradictoires.

§ 2. — PRODUITS SOLUBLES.

I. — Hammerschlag épuise par l'alcool-éther des Bacilles tuberculeux desséchés et obtient un extrait qui est toxique pour le lapin et le cobaye; les animaux auxquels on injecte ce produit meurent après avoir présenté des phénomènes convulsifs.

Auclair a obtenu un extrait éthéré de Bacille tuberculeux produisant les lésions de la pneumonie tuberculeuse quand on l'injecte dans la trachée du cobaye.

Weyl a extrait des bacilles une substance qui, injectée sous la peau des cobayes, provoque une nécrose au point d'inoculation.

Zuelzer a isolé des cultures un alcaloïde qui tue les cobayes en trois à quatre jours avec une violente élévation de la température, de la dyspnée, des hémorragies muqueuses, etc.

II. — Koch, Mafucci, Budden, Grancher, Straus et Gamaléia, Borrel observent que les cultures sur gélose stérilisées par la chaleur restent nocives pour les animaux et peuvent, à doses suffisantes, entraîner des suppurations, la cachexie et la mort, chez le cobaye. Les bacilles tués, injectés dans le sang ou le péritoine, provoquent la formation de véritables tubercules dans lesquels on trouve des bacilles morts, mais ces tubercules ne se généralisent pas et ne sont pas réinoculables.

III. **Tuberculine.** — La tuberculine a été préparée par Koch, en 1890, au moyen d'un procédé d'abord gardé secret.

La tuberculine est préparée ainsi qu'il suit à l'Institut Pasteur :

On fait une culture du Bacille de la tuberculose aviaire en bouillon glycériné, dans un matras (le Bacille humain et le Bacille aviaire sécrètent également de la tuberculine, mais le Bacille aviaire se développant plus rapidement, il y a avantage à l'utiliser). Il est indispensable que la culture se développe en voile; le voile apparaît du quinzième au vingtième jour à 37°; la culture est complète au trente-deuxième ou trente-cinquième jour.

La culture totale est stérilisée à 100° pendant quinze minutes, puis on la concentre au dixième au bain-marie; le liquide obtenu, filtré sur papier, constitue la *tuberculine brute*.

La tuberculine est un liquide brunâtre, sirupeux, elle répand une légère odeur suave caractéristique; elle n'a pas une composition définie, c'est un simple extrait des cultures stérilisées en bouillon glycériné, extrait qui contient, à côté des substances sécrétées par le bacille, celles qui préexistaient dans le bouillon. On n'a pu encore extraire le principe actif de la tuberculine.

On a cherché à purifier cette tuberculine brute :

a. En l'additionnant de 20 volumes d'alcool fort, on obtient un pré-

cipité brun contenant la substance active mélangée à de nombreuses matières étrangères; le tannin, l'acide picrique, les sels métalliques, le ferrocyanure de potassium et l'acide acétique déterminent également la formation d'un précipité albuminoïde qui entraîne la substance active; Koch, Hunter et Klebs ont échoué à purifier ce précipité.

b. En précipitant la tuberculine brute par 3 volumes d'alcool à 60°, Koch obtient un précipité floconneux qui, après dessiccation, abandonne une poudre blanche, c'est la *tuberculine purifiée*, contenant de nombreux principes étrangers, mais qui est très active : elle tue le cobaye à la dose de 1 milligramme. Cette méthode de préparation est très dispendieuse, les neuf dixièmes de la tuberculine restent dissous et se trouvent perdus.

Il n'y a aucun avantage à utiliser la tuberculine purifiée, elle a les mêmes propriétés que la tuberculine brute.

Action de la tuberculine sur l'homme et les animaux. — La tuberculine brute injectée à petites doses à des animaux sains ne produit aucun accident, ou élève très légèrement la température; un cobaye supporte sans troubles une injection de 2 centimètres cubes de tuberculine; le lapin supporte très bien l'injection de 5 centimètres cubes de tuberculine brute, il présente un peu de fièvre et un amaigrissement passager, mais il guérit vite; les bovidés, le chien ne réagissent pas à des doses de 10 centimètres cubes. L'homme est beaucoup plus sensible que le cobaye; une injection de $0^{cc},25$ provoque chez l'homme sain une indisposition assez grave : la température s'élève jusqu'à 39°, il survient des frissons, de la diarrhée, des vomissements (Koch); la dose de $0^{cc},01$ peut déjà produire une légère élévation de la température; l'homme est 1 000 à 1 500 fois plus sensible que le cobaye à la tuberculine.

Chez les animaux et l'homme tuberculeux, l'inoculation de faibles doses de tuberculine provoque des réactions intenses et des troubles graves pouvant aboutir rapidement à la mort.

Un demi-centimètre cube de tuberculine tue rapidement un cobaye tuberculisé depuis cinq à six semaines : il se produit une élévation brusque de température suivie d'un abaissement progressif et l'animal meurt dans le coma. A l'autopsie, on trouve une congestion intense autour des points tuberculeux, les organes sont rouges, congestionnés et présentent des taches ecchymotiques.

Chez les bovidés tuberculeux, des doses de $0^{cc},30$ à $0^{cc},40$ amènent dès la sixième heure une élévation de la température centrale qui passe de 36° à 39° et 40°, puis, au bout de quelques jours, tout revient à la normale; des doses plus fortes de tuberculine pourraient entraîner la mort de l'animal.

L'homme tuberculeux réagit avec une intensité formidable à l'inoculation de la tuberculine : un quart de centimètre cube le tuerait infailliblement.

Les doses soi-disant curatives de Koch étaient de 0^{cc},003 à 0^{cc},004 ; après l'inoculation il survenait des frissons, la température s'élevait jusqu'à 41°, souvent il se produisait de la toux, des nausées, des vomissements, de l'ictère, etc. ; au niveau des tuberculoses cutanées on voyait se produire une réaction inflammatoire intense. D'après Koch, ces symptômes devaient durer douze à quinze heures, puis faire place à une amélioration progressive des lésions préexistantes ; il est inutile de rappeler les désastres que la tuberculine a à son actif.

Inoculation intracérébrale. — Un cobaye de 500 grammes, qui tolère sous la peau 1 centimètre cube de tuberculine, meurt quand on lui injecte dans le cerveau 3 à 4 milligrammes de la même tuberculine (Lingelsheim, Borrel).

Un cobaye tuberculisé depuis douze jours succombe à l'inoculation intracérébrale de 1/10e de milligramme de tuberculine ; au quarantième jour de l'infection tuberculeuse, le cobaye est tué rapidement, avec du hoquet, des convulsions, des secousses musculaires, par l'inoculation intracérébrale de 1/1 000e de milligramme de tuberculine ; ces faits expliquent les accidents de la méningite tuberculeuse, seule forme de tuberculose où l'action du poison sur la cellule nerveuse soit mise en évidence (Borrel).

Les toxines tétanique, pesteuse, etc., ne sont pas plus actives dans le cerveau du cobaye tuberculeux que dans le cerveau du cobaye sain. Seule la *malléine* agit comme la tuberculine : la malléine non concentrée, inoffensive pour le cobaye tuberculeux quand on l'injecte sous la peau à la dose de 3 à 4 centimètres cubes, tue le même animal à 1/100e et 1/1 000e de centimètre cube quand on l'inocule dans le cerveau (Borrel).

Diagnostic de la tuberculose par la tuberculine. — A. — Nocard a montré que la tuberculine est un réactif précieux de la tuberculose des bovidés. Chez ces animaux le diagnostic précoce de la tuberculose est le plus souvent impossible par les moyens de la clinique ; or il est très important au point de vue de la prophylaxie de reconnaître dès le début les animaux atteints.

Les bovidés tuberculeux, si minimes que soient leurs lésions, réagissent à l'inoculation d'une dose de 0^{gr},30 à 0^{gr},40 de tuberculine brute ; leur température s'élève de 1°,5 à 3°. Les animaux non tuberculeux ne réagissent pas dans les mêmes conditions.

On opère de la façon suivante :

1° Préparer une *tuberculine diluée* :

Tuberculine brute...........................	1 centimètre cube.
Eau bouillie et phéniquée à 5 p. 1 000........	9 centimètres cubes.

Cette solution s'altère assez rapidement ; elle doit toujours être employée fraîche.

2° L'animal à éprouver est mis au repos, on lui prend la température rectale la veille et le jour de l'opération.

3° On injecte sous la peau de l'encolure, suivant la taille de l'animal, 3 à 4 centimètres cubes de tuberculine diluée, en prenant toutes les précautions d'asepsie ordinaires.

4° A partir de la douzième heure après l'injection, et de la douzième à la vingt-quatrième heure, on prend trois fois la température de l'animal. Tout animal qui présente une élévation de température atteignant 1°,4 doit être considéré comme tuberculeux. Un animal qui présente une élévation minime de 0°,5 à 0°,8 est sain. Quand l'élévation de la température est comprise entre 0°,8 et 1°,4, l'animal est simplement suspect et doit être soumis à une nouvelle épreuve, après un intervalle d'un mois.

B. — Chez l'homme on a utilisé la tuberculine pour reconnaître la tuberculose dans les cas douteux (Grasset, etc.). Cette épreuve, toujours dangereuse, ne doit être pratiquée qu'avec une extrême prudence et s'applique de préférence aux tuberculoses chirurgicales. En aucun cas la dose de tuberculine injectée ne devra dépasser 0gr,002. On utilisera la solution suivante :

Tuberculine brute.....................	4 centimètres cubes.
Eau bouillie phéniquée à 5 p. 1 000....	Q. S. pour 1 000 centimètres cubes.

Un centimètre cube contient 0gr,004 de tuberculine brute. Après avoir pris soigneusement la température pendant deux à trois jours, on injecte un demi-centimètre cube de la solution : on prend la température toutes les huit heures pendant trente-six heures et on observe avec soin l'organe supposé atteint par le bacille, la réaction locale présentant la plus grande importance au point de vue du diagnostic.

IV. **Tuberculines TA, TO et TR.** — Koch a étudié récemment un certain nombre de produits complexes retirés, par divers procédés, des cultures du Bacille tuberculeux. Ce sont les tuberculines TA, TO et TR ; cette dernière aurait une action d'arrêt sur l'évolution de la tuberculose.

Tuberculine TA (*Tuberculine alcaline*). — Les bacilles isolés par filtration d'une culture virulente sont traités par une solution de soude à 1 p. 10 : après un contact de trois jours à la température de la chambre les bacilles sont morts et le liquide peut être filtré sur papier. Après neutralisation, le filtrat est clair, légèrement jaunâtre, il renferme de nombreux cadavres de bacilles ; son inoculation produit les mêmes effets, mais un peu plus persistants, que l'injection de tuberculine ordinaire ; de plus il se produit

fréquemment des abcès à pus stérile. Après filtration sur bougie, TA donne des effets identiques à ceux de la tuberculine ordinaire.

Tuberculines TO et TR. — Les bacilles retirés d'une culture virulente sont desséchés dans le vide à l'abri de la lumière, puis portés dans un mortier d'agate et broyés longuement; cette opération, très dangereuse, doit être pratiquée avec les plus grandes précautions. La poudre obtenue est délayée dans de l'eau distillée et l'émulsion est soumise à une centrifugation prolongée pendant quarante à quarante-cinq minutes; on obtient ainsi deux couches : l'une liquide, opalescente, ne contenant plus de bacilles, est décantée, elle constitue la tuberculine TO.

La couche boueuse inférieure est desséchée, broyée de nouveau, délayée dans de l'eau distillée et soumise à la centrifugation; le résidu obtenu est traité de la même façon; on recommence plusieurs fois l'opération, et on mélange les liquides obtenus à chaque centrifugation. Le liquide provenant de ces centrifugations constitue la tuberculine TR.

Les tuberculines TO et TR sont très différentes.

La tuberculine TO n'est pas modifiée par l'addition de 50 p. 100 de glycérine; ses propriétés sont presque identiques à celles de la tuberculine ordinaire; ses propriétés immunisantes sont nulles ou peu marquées.

La tuberculine TR donne un précipité blanc floconneux par addition de 50 p. 100 de glycérine; elle n'est pas modifiée par l'addition de 20 p. 100 de glycérine, addition qui permet sa conservation. Elle jouit de propriétés immunisantes manifestes. Chez l'homme, l'inoculation répétée de très petites doses confère l'immunité contre la tuberculine ordinaire et les tuberculines TR et TO : les injections de quantités notables de ces produits ne donnent plus de réaction.

V. **Tuberculine de Maragliano.** — C'est une tuberculine aqueuse, obtenue en faisant macérer pendant une cinquantaine d'heures à 95°-100°, dans de l'eau distillée en quantité égale au volume du liquide de la culture employée, les bacilles retirés d'une culture en bouillon glycériné; la macération est ensuite réduite au dixième au bain-marie et filtrée sur papier. Le produit obtenu a les mêmes propriétés que la tuberculine ordinaire; il aurait des qualités vaccinantes; il tue le cobaye sain de 500 grammes à la dose de 5 centimètres cubes; le cobaye tuberculeux succombe à l'injection de $0^{cc},10$ à $0^{cc},20$ de cette tuberculine.

Précipitée par l'alcool, cette tuberculine donne une poudre tuant le cobaye à la dose de 1/25 000e et le lapin à la dose de 1/33 000e de leur poids.

VI. **Toxalbumine.** — Maragliano, Bezançon et Gouget ont étudié le liquide contenant des toxalbumines, obtenu en filtrant les cultures sur la bougie de porcelaine et en concentrant le filtrat au dixième de son volume, dans le vide, à 30°. Le produit obtenu diffère entièrement des tuberculines, il tue les animaux avec de l'hypothermie, sans jamais produire d'hyperthermie, même à dose non mortelle; il est plus toxique que la tuberculine.

§ 3. — VACCINATION.

I. — Grancher et Martin atténuent, par le vieillissement, des cultures de tuberculose aviaire, puis les inoculent au lapin; en donnant successivement des cultures de moins en moins vieilles, ils arrivent dans quelques cas à conférer une certaine immunité à l'animal.

II. — Héricourt et Richet stérilisent des cultures de tuberculose aviaire par plusieurs chauffages successifs à 80°, puis les injectent au lapin à la dose de 10 à 20 centimètres cubes; ce procédé leur a permis de conférer l'immunité à quelques animaux.

III. — Courmont et Dor filtrent des cultures en bouillon glycériné et injectent le filtrat à des lapins en même temps ou avant l'inoculation de virus tuberculeux; avec le Bacille aviaire ils ont réussi à conférer l'immunité deux fois sur quatre expériences, mais ils ont échoué avec le Bacille humain.

En résumé, on est arrivé, dans quelques cas, à vacciner le lapin contre la tuberculose aviaire, mais on a toujours échoué dans les essais dirigés contre la tuberculose humaine. Le cobaye n'a jamais pu être immunisé.

IV. — Koch pensa à immuniser et même à guérir les animaux et l'homme avec sa première tuberculine; de ses recherches et de celles de ses élèves (Pfuhl, Kitasato, etc.), il ne reste rien aujourd'hui.

Au moyen d'inoculations répétées de tuberculine TR, Koch a immunisé les animaux de laboratoire contre les poisons du Bacille tuberculeux (Voy. plus haut), et il a proposé l'emploi de cette tuberculine dans le traitement de la tuberculose humaine; les résultats favorables qu'il a annoncés n'ont guère été confirmés jusqu'à présent.

Chez l'homme la tuberculine TR s'emploie à de très faibles doses. Le produit livré par le laboratoire de Koch doit être dilué dans de l'eau glycérinée à 20 p. 100; on commence par en injecter 1/500e de milligramme, puis on répète les injections tous les deux jours en augmentant lentement la dose, de façon à ne jamais obtenir d'élévation de température supérieure à 0°,5; les effets immunisants ne se montrent que lorsqu'on atteint les doses de 0,5 et 1 milligramme.

V. — De Lannoïse a essayé d'appliquer au traitement de la tuberculose humaine un produit qu'il dénomme *organotoxine* et sur la préparation duquel il donne des renseignements incomplets : des cultures du Bacille tuberculeux en bouillon glycériné, âgées de trois à quatre mois, sont étendues, « après stérilisation, avec un mélange d'eau et de glycérine, pour obtenir les toxines à divers degrés ». Des injections répétées de ce produit (l'auteur n'indique pas

les quantités employées) auraient produit des améliorations chez des tuberculeux « ayant encore une certaine vitalité ».

§ 4. — SÉROTHÉRAPIE.

Les tentatives de sérothérapie de la tuberculose n'ont, jusqu'à présent, donné aucun résultat démonstratif.

Richet et Héricourt, injectant à des lapins du sérum de chien avant l'inoculation du Bacille de Koch, ont pu retarder chez ces animaux la marche de l'infection; malheureusement les succès ne furent toujours que très relatifs et inconstants. Il en fut de même des résultats obtenus par Bertin et Picq par l'injection de sérum de chèvre.

Behring et Niemann échouèrent également avec le sang d'animaux traités par la tuberculine.

Bernheim a essayé sans succès le sang provenant d'animaux inoculés avec des cultures de tuberculose filtrées et non chauffées; les résultats obtenus par Babès et Broca ne furent pas plus concluants.

Maragliano enfin a obtenu un sérum doué de *propriétés antitoxiques* évidentes. Il injecte à des animaux, à doses croissantes, un mélange de trois parties de tuberculine ordinaire et d'une partie de l'extrait de cultures filtrées sur porcelaine et non chauffées (Voy. p. 555). Après six mois de traitement et quand trois semaines se sont écoulées depuis la dernière injection, les sujets peuvent être saignés; leur sérum détruit *in vitro* les propriétés toxiques de la tuberculine et protège le cobaye contre ce poison : 1 centimètre cube de sérum préserve le cobaye sain contre une dose mortelle de tuberculine, 2 à 4 centimètres cubes rendent le cobaye tuberculeux capable de supporter sans accidents une dose de tuberculine qui le tuerait en quelques heures; les résultats obtenus dans l'infection par le Bacille de Koch ne sont pas encore concluants.

Agglutination. — Arloing a montré qu'on pouvait obtenir des cultures homogènes du Bacille de Koch en le cultivant en bouillon glycériné dans des matras cylindriques à fond plat et fréquemment agités; de telles cultures, âgées d'une dizaine de jours, se prêtent à l'obtention du phénomène de l'agglutination. Elles sont agglutinées à des proportions variant de 1 p. 5 à 1 p. 20 par le sérum des animaux ayant reçu des inoculations de tuberculine ou de bacilles vivants et par le sérum de la plupart des hommes tuberculeux (90 p. 100). Le phénomène ne se produit qu'après quelques heures de contact : on dépose le mélange de sérum et de culture dans de petits tubes de verre, stérilisés et maintenus inclinés et on observe plusieurs fois dans les vingt-quatre heures; la clarification est rare-

ment totale; le diagnostic, pour être complet, exige l'examen microscopique des amas. Jusqu'à présent le séro-diagnostic de la tuberculose ne semble guère applicable à la clinique.

PSEUDO-TUBERCULOSES.

A côté du Bacille de Koch il existe un certain nombre d'autres microorganismes pathogènes, capables de déterminer dans les tissus la formation de tubercules.

Le Bacille de la lèpre, celui de la morve, donnent lieu à la formation de véritables tubercules. A propos des *Streptothricées* nous verrons qu'un certain nombre de ces microorganismes *produisent des pseudo-tuberculoses* chez l'homme et les animaux.

Enfin certaines bactéries peuvent donner lieu à des lésions simulant à s'y méprendre celles que cause le Bacille de Koch; on peut ramener ces pseudo-tuberculoses à deux types : la *pseudo-tuberculose zoogléique* de Malassez et Vignal, Chantemesse, etc.; la *pseudo-tuberculose bacillaire* de Charrin et Roger, Dor, Courmont, Du Cazal et Vaillard, Legrain, etc.

Les descriptions des différents auteurs concordent mal, peut-être se rapportent-elles à un certain nombre de variétés voisines d'un même microorganisme. Il nous suffira d'avoir signalé l'existence de ces microbes; leur description ne saurait entrer dans le cadre de cet ouvrage.

CHAPITRE XXXI

LE BACILLE DE LA LÈPRE

Le Bacille de la lèpre a été découvert par Armauer Hansen. La lèpre est une affection contagieuse, propre à l'homme; les animaux n'en sont jamais atteints.

Article I. — TENTATIVES D'INOCULATION.

Toutes les tentatives d'inoculation ont échoué.

Chez l'homme, Arning aurait réussi à inoculer la lèpre au condamné Keanu, mais, dans ce cas, l'hypothèse d'une contagion naturelle peut être invoquée; il en est de même de deux ou trois autres observations où l'inoculation de la lèpre aurait été pratiquée avec succès. D'autre part, de très nombreux essais d'inoculation à l'homme ont donné des résultats négatifs entre les mains de divers expérimentateurs.

Chez l'animal, l'inoculation de tissus lépreux ou de cultures reste sans action. Les lésions qu'ont obtenues Melcher et Orthmann, Tedeschi, en inoculant au lapin des fragments de tissus lépreux, relevaient de microbes étrangers à la lèpre et probablement du Bacille de la tuberculose. De nombreuses inoculations pratiquées sur le singe (Babès), le porc (Hilairet et Gaucher, Widal), le chien (Neisser, Otto Danisch), le lapin (Wesener), les vertébrés à sang froid (Kobner) et plus récemment les tentatives de Besnier et Leloir, ont toujours échoué à reproduire la lèpre.

Quand on inocule sous la peau d'un animal un fragment de tissu lépreux, ce tissu conserve longtemps son aspect et, pendant plusieurs mois, on peut colorer les bacilles qu'il contient, mais on n'observe jamais de multiplication de ces bacilles; des leucocytes s'accumulent autour du corps étranger et celui-ci est résorbé peu à peu.

Article II. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

§ 1er. — ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Bacille de la lèpre a l'aspect de fins bâtonnets à bouts arrondis, de mêmes dimensions que le Bacille tuberculeux (5 à $6\,\mu \times 0{,}5\,\mu$). Les

bacilles sont droits ou très légèrement incurvés; d'ordinaire, ils sont plus rectilignes que ceux de la tuberculose; leurs extrémités sont parfois légèrement renflées.



Fig. 232. — Bacille de la lèpre (coupe de rate lépreuse). — Méthode de Ziehl-Nelsen (double coloration) (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Coloration. — Le Bacille de la lèpre, comme le Bacille de la tuberculose, se colore par les méthodes d'Ehrlich et de Ziehl, mais il fixe plus énergiquement que ce dernier les solutions hydroalcooliques de couleurs d'aniline. Il prend le Gram; après coloration par les solutions d'Ehrlich ou de Ziehl, il résiste beaucoup mieux que le Bacille de la tuberculose à l'action des agents décolorants. Il est donc aisé de différencier ces deux bacilles, nous donnons sous forme de tableau les termes principaux de ce diagnostic :

Bacille de la lèpre.	*Bacille de la tuberculose.*
Colorable par les solutions aqueuses de couleur d'aniline.	Non colorable par les solutions aqueuses non mordancées.
Se colore par la méthode de Gram.	Ne se colore pas par la méthode de Gram simple.
Prend le Ziehl et l'Ehrlich et résiste longtemps aux solutions acides.	Prend le Ziehl et l'Ehrlich, mais résiste beaucoup moins que le Bacille de la lèpre aux agents décolorants.
Se colore par la méthode de Baumgarten.	Ne se colore pas par la méthode de Baumgarten.
Bacilles en très grand nombre à l'intérieur des cellules des nodules lépreux.	Les cellules tuberculeuses contiennent un nombre restreint de bacilles.

Procédé de coloration de Baumgarten. — Colorer pendant cinq minutes à froid dans le violet aniliné, puis décolorer avec la solution suivante :

Alcool absolu	10 centimètres cubes.
Acide nitrique	1 centimètre cube.

Laver à l'eau distillée, sécher, monter.

Le Bacille de la lèpre reste coloré en violet; le Bacille de la tuberculose se décolore.

Après coloration, le Bacille de la lèpre est fréquemment granuleux ; son protoplasma contient des vacuoles irrégulières; aux extrémités apparaissent souvent des renflements facilement colorables et que certains auteurs considèrent comme des spores.

§ 2. — CULTURES.

Les cultures du Bacille de la lèpre sont encore mal connues ; Roux, Cornil et Chantemesse ont échoué à les obtenir; de nombreux expérimentateurs ont produit des cultures en ensemençant des lésions lépreuses : le plus souvent ces cultures ne relevaient pas du Bacille d'Armauer-Hansen, mais de microbes d'infections secondaires (Voy. plus loin).

C'est ainsi, par exemple, que Bordoni Uffreduzzi a décrit comme cultures du Bacille de la lèpre des cultures qui se rapportent évidemment au Bacille tuberculeux ; pas davantage les cultures de Neisser ne relèvent du Bacille lépreux ; les cultures de Babès étaient constituées par un bacille ne se colorant ni par l'Ehrlich ni par le Ziehl. Il ne semble pas que l'on doive accepter davantage les résultats de Ducrey, qui a obtenu des cultures d'un microbe anaérobie indéterminé.

Czaplewski, Spronck, Teich semblent avoir obtenu des cultures du Bacille lépreux; cependant les caractères de leurs cultures concordent mal. Spronck ensemence sur pomme de terre des pulpes de moelle osseuse lépreuse et de lépromes non ulcérés ; les colonies ainsi obtenues sont réensemençables sur le sérum coagulé, la gélose glycérinée, glucosée, et le bouillon de poisson (Voy. p. 543), mais non sur pomme de terre glycérinée. Le développement commence à 25°; il est abondant à 37°.

Pomme de terre glycérinée (*Première culture*). — Après dix jours à 37°, apparition de très petites colonies, jaunâtres, difficilement visibles.

Gélose glucosée-glycérinée. — Petites colonies incolores, irrégulièrement arrondies.

Sérum coagulé. — Petites colonies gris jaunâtre, irrégulièrement arrondies.

Bouillon de poisson. — Précipité visqueux adhérant aux parois du vase.

Les bacilles des cultures de Spronck sont agglutinables par le sang lépreux aux dilutions de 1 p. 70 à 1 p. 1 000, le sang de l'homme non lépreux n'agglutinant qu'aux dilutions de 1 p. 20 à 1 p. 30.

Article III. — RECHERCHE ET DIAGNOSTIC.

La recherche du Bacille de la lèpre est basée uniquement sur l'examen microscopique. Elle portera sur les frottis et les coupes préparés avec des humeurs et des tissus lépreux.

Le Bacille de la lèpre se trouve dans les tubercules lépreux, dans la moelle osseuse, dans la rate ; la figure 232 reproduit une de nos préparations de rate lépreuse. On trouve également le bacille dans les ganglions, les cellules nerveuses (Soudakewitch), la sanie lépreuse, la salive quand la muqueuse buccale est envahie, les fèces quand il existe de la lèpre du gros intestin, le sperme quand le testicule est envahi, le lait (Babès), etc.

Dans le sang, Arning n'a jamais rencontré le Bacille lépreux ; d'après Cornil et Babès, le bacille passerait dans le sang de la circulation générale quelques jours avant la mort et particulièrement pendant les accès de fièvre.

Les tubercules lépreux sont constitués par de grandes cellules analogues aux cellules épithélioïdes, ne possédant d'ordinaire qu'un seul noyau et bondées de bacilles : ce sont les *cellules lépreuses* ; certaines de ces cellules présentent des vacuoles.

Le Bacille lépreux a donc un siège intracellulaire. Les cellules s'incorporent le bacille, grâce à leurs mouvements amœboïdes ; les cellules nerveuses dans lesquelles on rencontre des bacilles englobent de même ceux-ci à la faveur des mouvements amœboïdes de leurs prolongements protoplasmiques.

Jamais on ne rencontre le bacille dans les leucocytes polynucléaires. Le Bacille de la lèpre semble conserver indéfiniment ses caractères dans les tissus où il s'est développé ; cependant, dans certains cas, on observe de la dégénérescence jaune.

La technique à employer pour la recherche du bacille est la suivante :

a. Les frottis sont colorés par la méthode de Ziehl ; on y différencierait le Bacille de la lèpre de celui de la tuberculose en faisant trois épreuves :

1° Simple coloration par une solution hydroalcoolique de fuchsine ;

2° Coloration par le procédé de Gram ;

3° Coloration par le procédé de Baumgarten.

b. Les coupes préparées avec des pièces durcies à l'alcool et incluses à la paraffine sont colorées par le Ziehl ; au besoin on les soumettrait aux procédés de diagnose exposés à propos des frottis.

Article IV. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

§ 1er. — ASSOCIATIONS MICROBIENNES.

Le Bacille de la lèpre, déterminant des érosions de la peau et des

muqueuses, des lésions du poumon, facilite la pénétration dans l'organisme d'un grand nombre de microbes qui viennent créer des infections secondaires.

Les lésions de la peau et des muqueuses sont rapidement envahies par les microbes de la suppuration (Staphylocoques, Bacille pyocyanique, etc.); dans de la sanie lépreuse, chez un lépreux de Tunis, nous avons pu reconnaître et isoler, à côté d'un petit nombre de Bacilles lépreux, le Staphylocoque doré, le Bacille pyocyanique et le *Bacterium coli*. Les microbes de la suppuration peuvent envahir l'organisme lépreux et déterminer une pyohémie rapidement mortelle (Babès).

Babès a noté fréquemment l'existence du Bacille de Koch chez les lépreux; c'est là une association fréquente, particulièrement dans le poumon; dans les lésions pulmonaires, encore, peut se rencontrer le Pneumocoque.

Dans trois cas de lèpre, Babès a rencontré dans la moelle osseuse, la rate et les reins, un bacille facilement cultivable, ne se colorant pas par les procédés d'Ehrlich et de Ziehl, et provenant d'une infection secondaire.

§ 2. — SÉROTHÉRAPIE.

Carasquilla, le premier, tenta d'obtenir du sérum antilépreux en injectant à de gros animaux du sang et du sérum de lépreux; Laverde, qui le suivit dans cette voie, injecte à des ânes, des brebis et des chevaux, du sang, du sérum lépreux, du suc de lépromes et même la pulpe d'un épithélioma du col utérin. Le sérum des animaux ainsi traités a une influence favorable sur l'évolution de la lèpre (injections de 10 à 20 centimètres cubes). Ces résultats furent confirmés par Buzzi, Abraham, Arning; au contraire, Hallopeau, Neisser, Brieger n'obtinrent aucun effet favorable du sérum antilépreux.

Metchnikoff et ses élèves montrent que le sérum de Laverde ne contient ni toxine ni produits lépreux, mais que l'injection de sérum, de sang ou d'éléments cellulaires à un animal d'une autre espèce provoque chez celui-ci la formation de poisons, les *cytotoxines*, capables de détruire les éléments cellulaires de l'animal qui a fourni le matériel d'inoculation. Dans le cas actuel, c'est à ces cytotoxines qu'il faudrait attribuer les améliorations observées chez les lépreux soumis à la sérothérapie : l'inconstance du succès s'explique par la fragilité des cytotoxines qui sont détruites par le transport, l'addition d'acide phénique, etc.

Metchnikoff et Besredka préparent une chèvre en lui injectant en trente-six jours 34 centimètres cubes de sang humain défibriné (homme sain); par ce traitement le sérum de l'animal a pris des propriétés agglutinantes et hémolytiques énergiques vis-à-vis du sang humain : un volume de sérum agglutine instantanément et dissout en sept minutes toutes les hématies d'un volume de sang humain.

L'injection à des lépreux de 1, 3, 7 centimètres cubes de ce sérum produisit, en même temps qu'une diminution des douleurs, de la congestion et de la suppuration de certains lépromes, aboutissant à la formation d'une escarre se détachant par la suite; rarement on observa un mouvement fébrile insignifiant. En un mot, bien que moins favorable, l'effet de ce sérum présente une grande analogie avec celui des produits obtenus par Carasquilla, Laverde, etc.

Metchnikoff pense que l'action favorable de tels sérums doit être attribuée à la *leucotoxine* résultant de l'introduction dans l'organisme animal de produits leucocytaires humains; cette leucotoxine doit, à doses convenables, produire une excitation du système leucocytaire; l'hémotoxine ne jouerait aucun rôle favorable et empêche l'inoculation de doses suffisantes de sérum. On devra donc tenter de préparer le sérum antilépreux en injectant à l'animal le sérum sanguin seul ou mieux encore des ganglions lymphatiques de l'homme.

CHAPITRE XXXII

LES STREPTOTHRICÉES

Les Streptothrix sont des végétaux inférieurs constitués par un protoplasma cellulaire ramifié ; ils se distinguent des Cladothrix, avec lesquels ils ont été longtemps confondus, en ce que les ramifications de ces derniers sont constituées par des cellules séparées, cloisonnées, disposées bout à bout en chaînettes (Metchnikoff). Sauvageot et Radais identifient le genre Streptothrix au genre *Oospora* (hyphomycètes); Trevisan classe les Streptothrix dans un genre nouveau : le genre *Nocardia*.

Les divers Streptothrix ont des caractères communs ; ils se développent aisément dans les milieux de culture artificiels ; dans les cultures liquides ils donnent de petits grumeaux ressemblant à des feuilles de nénuphar, le liquide n'est jamais troublé. Sur gélatine, ils forment de petites taches sphériques, étoilées ; sur pomme de terre, ils donnent des masses sèches, dures, écailleuses, dont l'aspect et la coloration varient suivant les espèces. Dans les cultures âgées sur les milieux solides, on voit s'élever au-dessus de la culture de nombreux filaments aériens portant des conidies qui donnent naissance à des spores rondes ou ovalaires, disposées en chaînettes. Pendant la germination, l'enveloppe des spores se brise, un jeune filament sort au dehors et se ramifie à son tour ; les filaments peuvent se reproduire par division transversale. Ainsi, selon l'âge de la culture, l'examen microscopique y montre des formes ramifiées, des spores en chaînettes très analogues à des Streptocoques, ou de petits filaments ressemblant fort au Bacille de la tuberculose aviaire : on conçoit que cette pléomorphie apparente ait pu pendant longtemps égarer les recherches des observateurs.

Article I. — **ACTINOMYCES BOVIS** (Bollinger et Harz).

Oospora bovis (Sauvageot et Radais). — Nocardia bovis (Trevisan).

Bollinger et Harz ont décrit sous le nom d'*Actinomyces bovis*, le parasite d'une maladie des bovidés connue depuis longtemps et caractérisée par la formation, dans les os maxillaires et la langue, de tumeurs dures, sarcomateuses, aboutissant à la fonte purulente. Peu après, Israël et Wolff rencontraient le microbe de Bollinger

dans un pus d'empyème, chez l'homme ; depuis, les observations d'actinomycose humaine se sont multipliées : on ne les compte plus aujourd'hui.

Chez l'homme on peut rencontrer, comme chez le bœuf, la tumeur du maxillaire, mais on observe fréquemment des lésions locales ou une maladie générale rappelant à s'y méprendre les affections dues au Bacille de Koch ; l'actinomycose du poumon est fréquente (broncho-pneumonies, pleurésies), et aussi l'actinomycose péritonéale ; le diagnostic clinique de l'actinomycose est souvent difficile à établir et l'examen microbiologique du pus, des crachats, est appelé à rendre de grands services. — L'actinomycose a été également observée chez le porc (Duncker, Hertwig).

§ 1er. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

Les premières inoculations d'Actinomyces faites à l'aide de cultures aérobies étaient restées sans résultat, mais J. Israël et Wolff purent infecter le lapin au moyen de cultures anaérobies.

Les inoculations pratiquées avec le pus de foyers d'actinomycose humaine ont souvent donné des résultats positifs : le cobaye, le lapin, la vache ont pu être infectés (J. Israël, Ponfick, Hanau, Dor et Bérard, etc.). Le lapin succombe après plusieurs mois à l'inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale. A l'autopsie on trouve des tumeurs actinomycosiques dans le péritoine, l'épiploon, le mésentère.

§ 2. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET RECHERCHE.

1° **Dans l'organisme.** — Dans l'actinomycose, le pus, les crachats et les tissus envahis renferment de petits grains, jaune-soufre ou rarement blanchâtres, opaques, dont les dimensions varient entre celles d'une spore de lycopode et d'un grain de millet ; c'est sur ces grains que l'on fera porter les recherches, en ayant soin de s'adresser à du pus fraîchement recueilli, le parasite se déformant rapidement. Quand les grains jaunes sont peu abondants et peu volumineux, on étale le pus en couche mince sur une lame porte-objet : on voit alors aisément les grains et on peut les recueillir pour l'examen.

En écrasant un grain jaune entre une lame et une lamelle, dans une goutte de glycérine, on obtient une préparation extemporanée qui permet de reconnaître le parasite. Après écrasement, le grain jaune se montre constitué par de petits corps mûriformes composés d'une masse centrale filamenteuse, feutrée, d'où partent de nombreux rayons divergents (ἀκτίς, rayon) dont la plupart sont renflés en massue à leur extrémité libre (*corps jaunes*, *massues* ou *crosses*).

Les *filaments* qui forment la masse centrale sont très enchevêtrés : ils paraissent ramifiés et sont mêlés à de petits corpuscules renflés ; de place en place, quelques filaments émergent et viennent se terminer à l'extérieur à côté des massues ; les filaments mesurent en moyenne 10 à 12 μ de long, les massues 20 à 30 μ de long sur 8 à 10 de large. Dans les tissus, autour du parasite, s'accumulent des cellules épithélioïdes à grand noyau ovalaire ; ces cellules, disposées en cercle, peuvent se fusionner pour constituer une cellule géante contenant plusieurs noyaux et le parasite lui-même ; les massues ou corps jaunes ne sont autre chose que des formes de dégénérescence du parasite sous l'influence de la réaction cellulaire ; elles n'existent pas au début des lésions, mais apparaissent au bout d'un certain temps et seulement dans les organismes résistants ; souvent même, quand la maladie marche vers la guérison, les filaments disparaissent et l'on ne trouve plus que les massues.

Coloration. — Les filaments de l'Actinomyces se colorent aisément par les couleurs basiques d'aniline et prennent le Gram ; les crosses se colorent par le picrocarmin, la safranine, l'éosine. Une préparation extemporanée, colorée par le picrocarmin, montre les crosles se détachant en jaune sur se fond rose des cellules.

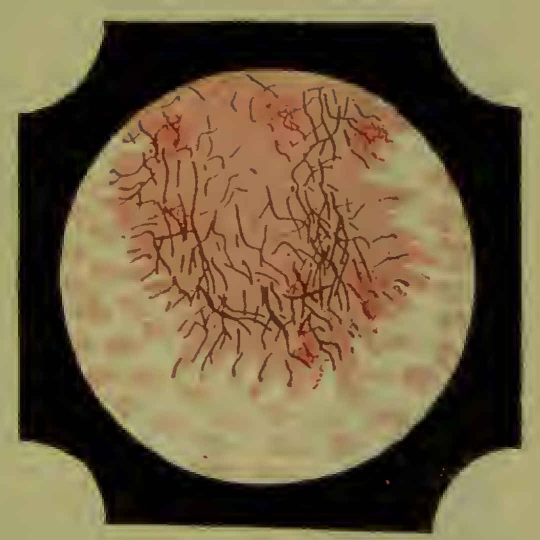


Fig. 233. — Coupe d'un tubercule d'actinomycose. — Méthode de Gram (Reich. ; Obj. 8 ; Oc. II).

Les grains, écrasés sur la lame, sont traités, après dessiccation et fixation, par le procédé de Gram avec coloration du fond à l'éosine ; les filaments sont colorés en violet, les crosses prennent une teinte jaunâtre ou rose (fig. 233). Ce procédé est applicable à la coloration des coupes ; on peut aussi employer le procédé de Weiggert (Voy. p. 224).

Pour colorer le pus, quand on n'a pas trouvé à l'œil nu de granulations jaunes, Lemière et Bécue recommandent le procédé suivant : 1° étaler le pus sur la lame, dessécher et laver à l'éther ; 2° faire agir quelques minutes une solution de soude à 30 p. 100 ; 3° colorer pendant quinze minutes dans une solution aqueuse d'éosine à 5 p. 100 ; 4° laver avec une solution aqueuse saturée d'acétate de soude et examiner dans cette solution. La masse centrale des amas d'Actinomyces est rouge, les massues sont colorées en rose jaune pâle.

2° **Dans les cultures.** — Dans les cultures, l'Actynomices revêt un aspect bien différent : on trouve des filaments ramifiés, des spores, dont la plupart sont réunies en chaînettes, et de courts filaments bacillaires provenant de la germination des spores; mais on n'observe pas les formes en crosses et en massues; dans les vieilles cultures, cependant, on peut rencontrer des formes d'involution, renflées, irrégulières, rappelant l'aspect des massues.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — L'Actinomyces est un anaérobie indifférent; son développement commence à + 20°, mais la température eugénésique est aux environs de 37°. La culture se ralentit à 40°, mais se poursuivrait jusqu'aux environs de 50°. L'Actinomyces se développe sur la plupart des milieux de culture, mais de préférence sur le sérum et les milieux glycérinés.

Il est assez difficile d'obtenir une culture d'Actinomyces en partant du pus; en effet, dans le pus, l'Actinomyces se trouve le plus souvent associé aux microbes ordinaires de la suppuration et ceux-ci envahissent le milieu de culture avant que le Streptothrix ait pu se développer. On a indiqué plusieurs procédés pour obtenir des cultures pures; le plus satisfaisant est celui qu'a indiqué Barstrom :



Fig. 234. — Actynomyces. — Culture sur gélose glycérinée, au quinzième jour.

On étale le pus à grains jaunes sur des plaques de gélatine : dès le deuxième jour, apparaissent des colonies autour d'un grand nombre des grains ensemencés; ces colonies sont produites par des microbes d'impureté; mais, à côté des grains qui ont donné lieu à une culture, on en remarque quelques-uns autour desquels la gélatine est restée stérile; avec une öse forte, on recueille ces derniers et on les transporte sur des tubes de sérum solidifié que l'on place à 37°. Au bout de cinq à six jours les cultures d'Actinomyces commencent à se développer. Il est bon de pratiquer toujours un certain nombre d'ensemencements sur sérum, beaucoup de ces ensemencements étant encore envahis par des microbes étrangers.

Bouillon glycériné. — A 37°, il se développe en cinq ou six jours des grains hémisphériques blancs, granuleux, qui tombent au fond du vase et peuvent atteindre la grosseur d'un pois; le bouillon reste limpide.

Sérum solidifié. — Vers le cinquième jour apparaissent de petits grains blanchâtres ou jaunâtres, secs, résistants, confluant bientôt.

Gélose glycérinée. — Dès le deuxième jour, petites colonies blanc jaunâtre, sèches, rugueuses, adhérentes à la gélose et confluant bientôt pour former une large bande jaunâtre, crevassée, couverte d'aspérités.

Gélatine. — Culture grêle ; liquéfaction minime et tardive.

Pomme de terre. — Vers le septième ou huitième jour, apparition de petites colonies incolores, quelques-unes proéminent bientôt et deviennent grisâtres, puis la culture s'épaissit et forme une membrane jaunâtre, rugueuse et mamelonnée, parfois cerclée de noir. La pomme de terre brunit autour de la culture.

Lait. — Pas de coagulation.

§ 3. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — L'*Actinomyces bovis* est assez résistant aux agents de destruction ; d'après Wolff, ses cultures sont tuées en dix minutes à 70°, mais Liebmann a constaté que les spores résistent quatre-vingts minutes à l'ébullition et une heure trois quarts à une température sèche de 140°. Le sublimé à 1 p. 1 000 tue les spores en cinq minutes, l'acide phénique à 5 p. 100 serait sans action, mais il suffirait d'ajouter à 10 centimètres cubes de culture en bouillon une goutte de solution de bleu de méthylène à 1 p. 100 pour la stériliser.

Virulence. — D'après Liebmann, l'Actinomyces s'atténue en passant par le corps de l'homme et des animaux ; on peut lui rendre son pouvoir végétatif et ses propriétés pathogènes en le faisant croître sur une plante : Liebmann inocule l'Actinomyces dans une graine, le parasite se développe en même temps que la graine et envahit la plante qui en provient, sous forme de filaments très courts capables d'infecter les tissus des animaux.

Associations microbiennes. — Dans l'organisme l'Actinomyces est fréquemment associé à des bactéries ; les associations avec les microbes de la suppuration sont les plus fréquentes ; dans les lésions pulmonaires, il se rencontre parfois à côté du Bacille de Koch ; aussi devra-t-on toujours rechercher ce dernier quand on aura décelé dans les crachats la présence de l'Actinomyces.

Article II. — STREPTOTHRIX MADURÆ (Vincent).

Oospora Maduræ. — Nocardia Maduræ (Trevisan).

L'affection connue sous le nom de *Pied de Madura* est due à un streptothrix décrit par Vincent.

Quand on incise et exprime une des petites nodosités caractéristiques de la maladie, il s'écoule un pus sanieux contenant de petits grumeaux jaunâtres, grisâtres ou noirs, ovoïdes ou arrondis, ressemblant aux grains d'actinomycose. Leur volume est compris entre celui d'un grain de mil et celui d'une tête d'épingle ; ils sont constitués par d'innombrables filaments mycéliens étroitement enchevêtrés.

Toutes les tentatives d'inoculation aux animaux ont échoué (Vincent, Nocard).

§ 1er. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET RECHERCHE.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Les frottis obtenus avec les grumeaux sont parsemés de filaments droits ou flexueux, intriqués, très grêles, mesurant 1 μ à 1μ,5 d'épaisseur. Dans les points les moins touffus, les filaments apparaissent pourvus de ramifications ; à la périphérie des bouquets mycéliens on note une disposition rayonnée ; on voit fréquemment, à l'extrémité ou dans la continuité des filaments, de petits renflements irréguliers, mesurant 2 μ environ, mais jamais il n'existe de formes en crosses ou en massues. Tous ces détails sont visibles avec un grossissement de 400 à 500 diamètres, après coloration par le bleu de méthylène ou la fuchsine de Ziehl diluée.



Fig. 235. — *Streptothrix Maduræ* (d'après Vincent).

Dans les cultures, on retrouve les mêmes dispositions ; cependant les filaments sont plus grêles et leur largeur n'excède pas 1 μ. Dans les cultures âgées de deux semaines, l'extrémité des filaments se fragmente souvent en une série de segments réguliers, ovoïdes, plus larges que les filaments eux-mêmes : ce sont des rameaux fructifères. Les spores ont 1,5 à 2 μ de largeur ; elles sont ovoïdes, accouplées par deux ou trois, ou en chaînettes, ou en amas volumineux ; elles sont brillantes, leurs contours sont nettement accusés. Ensemencées dans du bouillon neuf, elles s'allongent à une de leurs extrémités et forment un court bâtonnet à bouts arrondis.

Coloration. — Le *Streptothrix Maduræ* fixe très facilement les couleurs basiques d'aniline ; il se colore par la méthode de Gram.

L'éosine et la safranine le colorent faiblement, l'iode le teinte en jaune et l'hématoxyline en violet. — Les spores se colorent bien par les couleurs basiques et par la méthode de Gram.

Coupes. — Exciser de petits fragments de peau comprenant soit des nodules encore jeunes, durs et douloureux, soit des nodules en voie de ramollissement. L'examen de ces pièces présente quelques difficultés, par suite de la facilité avec laquelle les grains s'énucléent des tissus. Vincent recommande le procédé suivant :

Les fragments de peau sont durcis successivement par l'alcool à 60°, 80°, 90° et 100° ; puis on pratique l'inclusion à la paraffine. Les coupes, collées sur la lame porte-objet (Voy. p. 223), sont colorées par le carmin de Orth alcoolisé et la méthode de Gram.

Sur de telles coupes, l'ensemble de la zone malade forme un volumineux tubercule au centre duquel se trouve le bloc mycélien présentant l'aspect que nous avons décrit plus haut.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le *Streptothrix Maduræ* se développe de + 20° à 40°, mais la température optima de culture est de 37°. Il est strictement aérobie. Le développement est toujours très minime dans les milieux usuels : les infusions végétales fournissent les milieux les plus favorables.

Pour isoler le parasite à l'état de pureté, on stérilise la surface cutanée, puis on ponctionne une nodosité avec un bistouri flambé, et par l'ouverture on introduit l'extrémité d'une pipette effilée dans laquelle on aspire le contenu de la petite tumeur. On pratique l'ensemencement dans un des milieux suivants.

Infusions végétales. — L'infusion de paille ou de foin (débarrassé des plantes aromatiques), à raison de 15 grammes par litre, fournit un excellent milieu de culture ; il en est de même d'une infusion de 20 grammes de pomme de terre pour un litre d'eau. La culture se fait de préférence dans un flacon d'Erlenmeyer où l'accès de l'air est facile.

A 37°, dès le quatrième jour, apparaissent de petits flocons grisâtres dont quelques-uns se fixent aux parois du vase, les autres tombant au fond. Au bout de vingt à trente jours ces flocons ont acquis le volume d'un petit pois ; quelques-uns d'entre eux brunissent à leur centre ; d'autres, restés adhérents à la paroi près de la surface du liquide, prennent une coloration rose ou rouge au bout de un à deux mois. Le liquide ne se trouble jamais ; il prend à la longue une faible réaction alcaline et se fonce légèrement, souvent sa surface se couvre d'une efflorescence blanche formée par les spores.

Bouillon de viande. — La culture est très grêle; il sa forme, vers le quinzième ou le vingtième jour, de petits grains arrondis, grisâtres; le liquide reste clair. Au bout de plusieurs passages en bouillon, la culture devient plus abondante.

Gélatine. — Dans la gélatine ordinaire, il se développe, le long de la piqûre et à la surface, une culture blanche très grêle. Le développement est plus abondant dans le milieu suivant :

Infusion de foin ou de pomme de terre....	100 centimètres cubes.
Gélatine..................................	9 grammes.
Glycérine.................................	4 —
Glycose..................................	4 —

Neutraliser et stériliser.

Le *Streptothrix Maduræ* ne liquéfie pas la gélatine.

Gélose glycosée-glycérinée. — La gélose ordinaire convient mal au *Streptothrix Maduræ*; au contraire, sur gélose glycosée-glycérinée il donne une culture abondante, constituée par des colonies saillantes, vernissées, arrondies, d'abord blanc jaunâtre et prenant ensuite une teinte rose ou même rouge vif disparaissant à la longue. Quand les colonies sont peu confluentes, elles deviennent volumineuses et s'ombiliquent, la dépression centrale reste blanche et le bourrelet devient rougeâtre.

Pomme de terre. — Vers le cinquième jour à 37°, apparaissent de petites éminences blanchâtres qui prennent ensuite l'aspect de végétations mamelonnées et mûriformes. Au niveau de la culture, la pomme de terre est déprimée, mais elle ne change pas de couleur. Après un mois, les colonies prennent par places une teinte rose pâle, qui s'accentue de plus en plus, devient rouge vif, orangé ou rouge foncé; la coloration est d'autant plus intense que la pomme de terre est plus acide; elle peut être nulle sur certaines pommes de terre; quelques colonies paraissent saupoudrées d'une fine poussière blanchâtre constituée par des spores.

Lait. — Développement sans coagulation.

Sérum, œuf. — Pas de développement.

§ 2. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — Le *Streptothrix Maduræ* est très résistant à la dessiccation : des cultures desséchées pendant neuf mois sur du papier buvard stérilisé ont donné des ensemencements fertiles; une culture sur pomme de terre âgée de vingt et un mois possédait encore sa vitalité. Les cultures non sporulées sont tuées par une exposition de trois à cinq minutes à 60°; les spores résistent cinq minutes à 75°; elles sont tuées en trois minutes à 85°.

Associations microbiennes. — Dans les nodules suppurés, ouverts à l'extérieur, Vincent a rencontré, à côté du Streptothrix, les Staphylocoques blanc et doré.

Article III. — STREPTOTHRIX ASTEROÏDES (Eppinger).

Oospora asteroïdes (Sauvageot et Radais). — Nocardia asteroïdes (Trevisan).

Eppinger a observé un cas de méningite liée à un abcès cérébral et dans le pus de laquelle existait, en culture pure, un streptothrix. Depuis, le même auteur a retrouvé plusieurs fois ce parasite dans des affections simulant la tuberculose. Almquist a découvert, dans le pus d'une méningite, un streptothrix qui semble analogue à celui d'Eppinger.

Inoculations. — Le Streptothrix d'Eppinger est pathogène pour le lapin et le cobaye ; les animaux succombent à une affection pseudo-tuberculeuse ; dans les tubercules le parasite abonde.

Aspect microscopique. — Le *Streptothrix asteroïdes* se présente dans le pus sous la forme de filaments ramifiés, ayant environ 0 μ, 2 de large. Dans les cultures, on trouve des formes en coccus (spores), de petits filaments bacillaires et des formes ramifiées. Dans les vieilles cultures, le contenu des filaments n'est pas homogène, il y existe des vacuoles séparant des granulations cubiques ou arrondies. Au début du développement, les filaments sont fréquemment disposés en étoiles. — Le microbe d'Eppinger se colore par les couleurs basiques et prend le Gram.

Cultures. — Le milieu de culture le plus favorable est la gélose glycosée à 2 p. 100; les colonies y forment des verrues blanchâtres prenant à la longue une teinte rouge ocreuse en même temps que leur surface se ride et se plisse. En gélatine la culture est grêle, sans liquéfaction du milieu.

Article IV. — MICROMYCES HOFFMANNI (Max Grüber).

Oospora Hoffmanni. — Nocardia Hoffmanni (Trevisan).

Max Grüber a isolé de l'air un streptothrix, *Micromyces Hoffmanni*, qui se rapproche beaucoup de l'*Actinomyces bovis*, mais dont l'inoculation produit, chez le lapin, des abcès locaux guérissant spontanément. Les cultures commencent à partir de $+22°$; elles se font de préférence sur la gélose glucosée; il ne se produit pas de développement sur la pomme de terre et la gélatine ordinaire.

ARTICLE V. — STREPTOTHRIX DU FARCIN DU BOEUF (Nocard).

OOSPORA FARCINICA (Sauvageot et Radais).

Le Streptothrix du farcin du bœuf, décrit par Nocard, n'est pas pathogène pour l'homme.

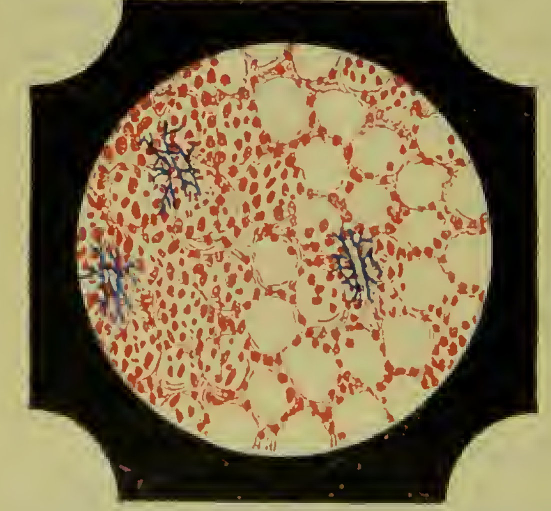
Le farcin du bœuf, qu'il ne faut pas confondre avec le farcin de l'homme et du cheval produit par le Bacille de Schütz-Löffler, n'atteint que les bovidés ; il est caractérisé par la formation d'adénites et de lymphangites superficielles, puis par des lésions tardives des poumons et des viscères.

§ 1er. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

Le Streptothrix de Nocard est inoculable au bœuf, au mouton et au cobaye. Le cobaye est l'animal de choix pour les inoculations expérimentales. Le lapin, les équidés, le chien sont réfractaires.

L'inoculation sous-cutanée provoque, chez le cobaye, la formation d'un vaste abcès compliqué de lymphangite ; l'abcès s'ouvre au dehors et l'animal guérit.

L'inoculation intrapéritonéale provoque, au bout de deux à trois semaines, le développement d'une péritonite d'apparence tuberculeuse ; l'épiploon, la surface des viscères abdominaux sont couverts de tubercules.


Fig. 236. — Farcin du bœuf. — Poumon de mouton. — Méthode de Gram (Reich. ; Obj. 9 ; Oc. II).

L'injection intraveineuse tue rapidement le cobaye en produisant une véritable tuberculose miliaire généralisée ; tous les viscères sont infiltrés par les tubercules.

§ 2. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET RECHERCHE.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le Streptothrix du farcin se présente sous la forme de fins filaments enchevêtrés en pelotons, de la périphérie desquels partent de nombreux prolongements rappelant l'aspect d'une semence de bardane.

Les filaments ne présentent qu'un petit nombre de ramifications. On ne trouve jamais de formes en massues.

Dans les cultures on rencontre de nombreuses spores ovoïdes, très petites, non colorables par les procédés ordinaires.

Coloration. — Le Streptothrix de Nocard fixe les couleurs basiques et prend le Gram.

Recherche. — On recherche le parasite dans les lamelles préparées avec le pus et colorées par la méthode de Gram et l'éosine.

Les coupes des lésions pseudo-tuberculeuses, effectuées sur des fragments durcis à l'alcool et inclus dans la paraffine, sont colorées par la méthode de Gram avec fond à l'éosine ou au picrocarmin de Orth; au centre des tubercules se rencontrent les pelotons de filaments.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le *Streptothrix farcinica* est strictement aérobie; il cultive entre $+30°$ et $40°$ sur les milieux ordinaires. Il est aisé d'en obtenir des cultures pures en opérant le prélèvement avec une pipette Pasteur au centre d'un abcès non ouvert à l'extérieur.

Bouillon. — Flocons blanchâtres, irréguliers, dont quelques-uns flottent à la surface en formant une pellicule grisâtre, poussiéreuse, les autres tombant au fond du vase. Le liquide reste clair.

Bouillon glycériné. — Développement analogue mais plus abondant.

Gélose. — Il se développe de petites colonies arrondies, saillantes, opaques, blanc jaunâtre, qui confluent pour former une culture mamelonnée, plissée, terne et poussiéreuse.

Sérum. — Mêmes caractères que sur gélose, mais culture moins abondante.

Pomme de terre. — Culture abondante constituée par des plaques très saillantes, sèches, rugueuses, jaunâtres, à bords taillés à pic.

Lait. — Développement sous forme de petits grains grisâtres, sans coagulation du liquide.

Article VI. — STREPTOTHRIX CAPRÆ (Silberschmidt).

OOSPORA CAPRÆ (?). — NOCARDIA CAPRÆ (?).

Ce streptopthrix a été rencontré dans le poumon d'une chèvre atteinte d'une pseudo-tuberculose.

§ 1er. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

Les cultures du *Streptothrix capræ* sont virulentes pour le lapin, le cobaye; la souris blanche est moins réceptive.

Chez le lapin et le cobaye, en injection sous-cutanée, le Streptothrix produit un abcès; en injection intraveineuse, il occasionne la formation de tubercules dans les divers organes. « A l'examen histologique, ces tuber-

cules présentent une structure analogue à celle des tubercules dus au Bacille de Koch ; les tubercules pulmonaires offrent des cellules géantes ; ils se caséifient rapidement (Silberschmidt). »

§ 2. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Filaments très fins, plus ou moins longs, plus ou moins ramifiés ; dans l'organisme, les formes longues dominent ; au contraire, dans les cultures sur gélose et les colonies superficielles en bouillon, on observe surtout des formes courtes, en bâtonnets. Le *Streptothrix capræ* est immobile ; dans les cultures, il forme des *spores* allongées, se décolorant assez facilement et résistant mal à la chaleur.

Coloration. — Le *Streptothrix capræ* se colore par les couleurs basiques en solutions mordancées ; il prend le Gram. Dans les organes, la coloration du microbe est plus difficile que dans les cultures ; la méthode de Gram avec coloration du fond à l'éosine est le procédé de choix.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le *Streptothrix capræ* pousse à la température ordinaire et mieux à 33°-37° ; il est presque exclusivement aérobie ; les milieux usuels lui conviennent et surtout le bouillon sucré à 2 p. 100 et la pomme de terre.

Gélatine. — Pas de liquéfaction. Sur plaques, les colonies se développent lentement et rappellent, en petit et en moins fin, l'aspect des colonies de moisissures. En piqûre, il se produit, dans la profondeur, des colonies isolées, floconneuses, et, à la surface, une couche sèche, brunâtre.

Gélose glycérinée. — Couche sèche, brunâtre, se saupoudrant de blanc par la suite ; la culture s'enfonce à l'intérieur de la gélose sous forme de prolongements radiés fins ; parfois le centre des colonies se creuse en cratère.

Bouillon. — Employer de préférence le bouillon sucré. Les cultures sont visibles dès vingt-quatre à quarante-huit heures de séjour à 37° ; le bouillon reste clair, il se produit à la surface de petites colonies, en forme de minces disques concaves, secs et blanchâtres, devenant cohérents, recouvrant toute la surface du liquide et grimpant le long des parois ; quelques colonies tombent au fond du tube et y constituent un dépôt peu abondant.

Pomme de terre. — Culture mince et blanchâtre, puis proéminente, colorée en brun rosé et saupoudrée de blanc.

Lait. — Revêtement blanc rosé à la surface du liquide ; pas de coagulation.

CHAPITRE XXXIII

LES LEVURES PATHOGÈNES

SACCHAROMYCES ALBICANS (Audry).

Oïdium albicans (Robin), Syringospora Robini (Quinquaud).

Ch. Robin a découvert et décrit le parasite du muguet sous le nom d'*Oïdium albicans*; les recherches d'Audry ont établi que ce microorganisme est une levure, un Saccharomyces.

Le parasite du muguet se trouve répandu dans l'air, il pénètre à tout moment dans les voies aériennes, mais il ne cultive sur la muqueuse buccale que lorsque la sécrétion salivaire se trouve modifiée par une maladie antérieure. Le muguet peut envahir l'œsophage, l'estomac, parfois même l'anus, les grandes lèvres. Dans certaines conditions exceptionnelles le parasite passe dans le sang et cause une infection généralisée (Wirchow, Wagner, Schworb, Roger).

§ 1er. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

Injecté dans la chambre antérieure de l'œil (Grawitz) ou dans le péritoine du lapin (Plaut), le *Saccharomyces albicans* produit des lésions locales. L'inoculation d'une culture pure dans la veine auriculaire du lapin détermine une mycose généralisée, avec envahissement des viscères par le parasite, et aboutissant à la mort (Klemperer, Roux et Linossier, Charrin et Ostrowsky).

§ 2. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET RECHERCHE.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

A. **Dans l'organisme.** — On décèle aisément le parasite dans les concrétions blanchâtres de la stomatite crémeuse; pour cela on prélève un petit fragment de la concrétion, on le dissocie dans une goutte d'eau sur le porte-objet, on fait agir pendant quelques instants la liqueur de Gram forte (p. 217) et on couvre d'une lamelle : la levure se colore en brun par l'iode. — On peut encore dissocier le fragment

dans une goutte d'acide acétique qui pâlit les cellules épithéliales et rend le parasite plus visible. — Enfin, des frottis desséchés peuvent être traités par une solution aqueuse d'une couleur basique d'aniline; ces couleurs se fixent sur le protoplasma des cellules parasitaires.

Les plaques de muguet sont constituées par le parasite et des cellules épithéliales. Le Saccharomyces se présente sous l'aspect de longs filaments tubuleux, cloisonnés, enchevêtrés et entremêlés de corpuscules ovoïdes ou arrondis présentant un gros nucléole (mycélium et spores des anciens auteurs).

B. **Dans les cultures**. — L'aspect du *Saccharomyces albicans* diffère totalement suivant la nature du milieu où s'est fait le développement. Dans les cultures en bouillon, il existe des formes analogues à celles que nous venons de décrire : longs filaments enchevêtrés, entremêlés de nombreuses cellules ovalaires. — Dans le vin, on ne voit que des filaments sans cellules ovalaires. — Dans les cultures sur milieux solides, on n'observe que des cellules ovalaires rondes, irrégulières, isolées ou réunies en groupements irréguliers, entourées d'une membrane réfringente qui ne fixe pas les couleurs basiques; quelques-unes de ces cellules sont en voie de bourgeonnement. — Dans le liquide de Nœgeli, le développement revêt des caractères particuliers : on assiste à la formation des spores (que l'on n'observe jamais dans les autres milieux de cultures) : l'examen microscopique montre des chapelets de cellules ovalaires à l'extrémité desquels apparaissent des formes sphériques volumineuses, les *clamydospores*. A l'intérieur de ces sphères se forment les *spores* qui sont mises en liberté par déhiscence. Pour étudier les clamydospores, il ne faut pas transporter le Saccharomyces dans une goutte d'eau, ce liquide déterminant l'éclatement des clamydospores et la mise en liberté des spores; l'examen sera pratiqué dans une goutte du liquide qui a servi à la culture ou de glycérine.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le Saccharomyces se développe entre +20° et 39° sur la plupart des milieux de culture. Il est exclusivement aérobie; il pousse bien sur les milieux légèrement acides, neutres ou modérément alcalins; une alcalinité forte ralentit la culture et diminue la formation du mycélium.

On obtient les cultures en prélevant une parcelle de concrétion crémeuse et en l'étalant sur une plaque de gélatine, après l'avoir comprimée entre deux doubles de papier filtre stérilisé; il est préférable de délayer la concrétion dans un peu d'eau stérile et de pratiquer un isolement sur gélatine avec une goutte de cette eau.

Gélatine. — L'aspect des colonies est caractéristique ; rapidement il se forme des taches sphériques ayant l'apparence de petites perles très blanches; les colonies ne prennent jamais de grandes dimensions, la gélatine n'est pas liquéfiée.

Gélose. — A 37°, le développement est très rapide, les colonies sont étalées, lisses et blanches.

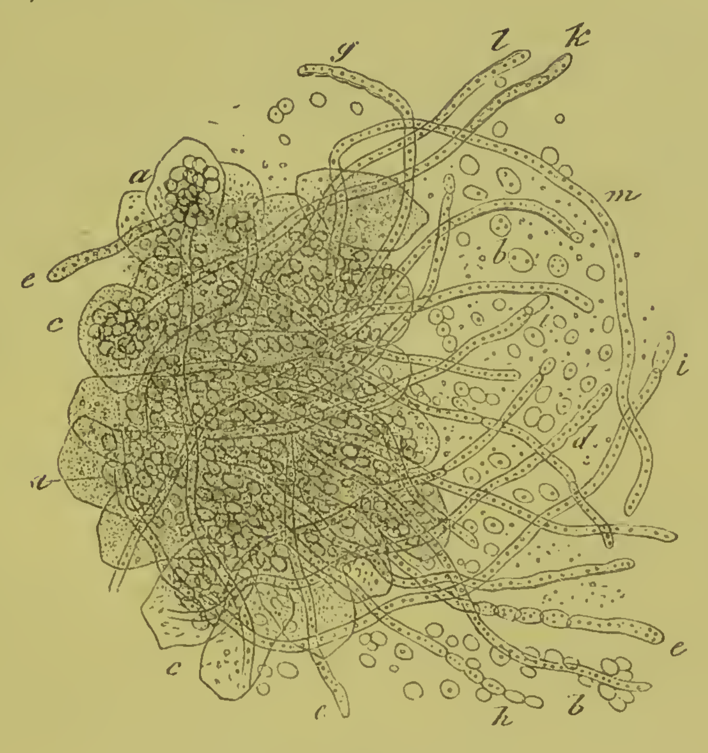


Fig. 237. — Muguet buccal.

Pomme de terre. — Petites colonies saillantes, blanc sale, parfois tachetées de noir.

Carotte. — Sur des tranches de carotte, stérilisées à l'autoclave dans des tubes de Roux, le *Saccharomyces albicans* donne en quarante-huit heures une culture abondante d'un blanc éclatant.

Bouillon, vin stérilisé, liquide de Nœgeli. — Petits grumeaux blancs, le liquide restant clair.

Salive. — Le *Saccharomyces albicans* ne peut être cultivé dans la salive (Roux et Linossier) ; ce fait explique pourquoi le muguet se développe de préférence dans les deux premiers mois de la vie, alors que la sécrétion salivaire n'a pas commencé, ou au cours des maladies qui entraînent une diminution de la sécrétion de la salive.

SACCHAROMYCES SUBCUTANEUS TUMEFACIENS (Curtis).

Curtis a observé chez l'homme une tumeur myxomateuse de la cuisse causée par un parasite qu'il a nommé *Saccharomyces subcutaneus tumefaciens*.

Maladie expérimentale.

Le rat, la souris et le chien sont réceptifs.

Le rat et la souris, à la suite de l'inoculation sous-cutanée d'une petite quantité de culture, présentent une tumeur analogue à celle de l'homme et prenant parfois un développement énorme ; l'animal peut succomber au bout d'un temps fort long, mais le sang n'est jamais envahi. Parfois des formations néoplasiques envahissent tous les viscères sous la forme d'un semis de petits points blancs. Dans les tumeurs, on retrouve toujours le Saccharomyces en culture pure.

Chez le lapin, l'inoculation intraveineuse n'entraîne aucun trouble ; l'inoculation sous-cutanée produit un petit abcès qui aboutit à la guérison.

Le cobaye est absolument réfractaire.

Aspect microscopique.

Dans l'organisme, le *S. tumefaciens* se présente sous la *forme encapsulée* ; la capsule manque d'ordinaire dans les cultures.

a. Après quarante-huit heures à 37°, les cultures sur gélose sont constituées par des cellules rondes ou ovoïdes de 3 à 6 μ de diamètre, entourées d'une membrane à doubles contours et contenant un ou deux petits grains réfringents ; dans les cultures jeunes, les cellules ovoïdes sont plus nombreuses que les cellules sphériques et presque toutes portent à une de leurs extrémités un petit bourgeon ; le violet de méthyle 6B teinte en violet foncé le centre de ces cellules et en violet rouge leur paroi ; les grains réfringents restent incolores. La levure prend le Gram.

b. Dans les tissus de l'homme et des animaux, le parasite devient beaucoup plus volumineux : on trouve de grosses sphères de 16 à 20 μ de diamètre, pourvues d'une paroi propre d'environ 0 μ,5 d'épaisseur et entourées d'une capsule hyaline de 8 à 10 μ d'épaisseur. On rencontre également des formes ovoïdes et des cellules en voie de bourgeonnement ; le bourgeon naissant et la cellule mère sont alors contenus dans la même capsule, les jeunes bourgeons sont remplis de grains de chromatine.

Coupes. — Curtis recommande la méthode suivante de coloration :

1° Colorer pendant quelques minutes dans le carmin de Orth.

2° Faire agir pendant dix minutes la solution suivante :

Solution saturée de violet de méthyle 6B dans l'alcool absolu	1 centimètre cube.
Solution aqueuse de potasse caustique à 1 p. 10 000	9 centimètres cubes.

3° Décolorer pendant une minute avec la solution suivante :

Acide pyrogallique	1 gramme.
Eau distillée	100 centimètres cubes.

4° Déshydrater et monter dans le baume.

Caractères des cultures.

Le *S. tumefaciens* est aérobie; il se développe à la température ordinaire et mieux à 37°, sur les milieux neutres ou légèrement acides.

Gélose. — Au bout de quarante-huit à soixante-douze heures, quand la semence a été prise sur l'animal, apparaissent des colonies punctiformes, blanches et opaques, se fusionnant à la longue, mais ne formant jamais une strie uniforme. Après plusieurs passages sur gélose, la culture est plus rapide et plus abondante : on obtient une strie brillante, épaisse et crémeuse, réensemençable même après six mois.

Gélatine. — Le long de la piqûre, petite traînée blanche, discontinue, composée de colonies punctiformes, plus abondantes à la surface qu'à la partie inférieure du tube. La gélatine n'est jamais liquéfiée.

Bouillon. — Culture minime constituée par de petits flocons blanchâtres tombant au fond du tube, le liquide reste clair.

Touraillon et moût de bière. — Donnent des cultures plus abondantes que le bouillon; il en est de même de tous les milieux possédant une acidité correspondant à 0,3 ou 0,5 d'acide sulfurique par litre.

Pomme de terre. — A 37°, en quarante-huit heures, il se développe une strie blanche et sèche qui brunit à la longue. La culture est plus luxuriante sur la *pomme de terre glycérinée.*

Sérum. — Pas de développement.

ESPÈCES NON DÉFINIES.

Achalme et Troisier (angine), Bum (abcès humain), Maffucci et Sirleo, Lydia Rubinowitch, etc., ont rencontré des levures pathogènes.

Une levure, rencontrée par San Felice dans le jus de fruits fermentés, tuait le cobaye en trente jours avec formation d'une tumeur molle au lieu d'inoculation (*Saccharomyces neoformans*). Le même auteur a trouvé, dans le ganglion d'un bœuf atteint d'une affection carcinomateuse du foie, une levure qui produit, chez le cobaye, des tumeurs contenant des concrétions calcaires (*Saccharomyces lithogenes*).

CHAPITRE XXXIV

LES MOISISSURES PATHOGÈNES

Article I. — ASPERGILLUS FUMIGATUS.

Laulanié a montré que l'*Aspergillus fumigatus* est susceptible de produire chez l'animal une pseudo-tuberculose expérimentale ; Dieulafoy, Chantemesse et Widal, Potain, R. Boyce, Gaucher et Sergent, Rénon, etc., ont observé des cas de pseudo-tuberculose aspergillaire chez l'homme.

La tuberculose aspergillaire de l'homme sévit uniquement chez les gaveurs de pigeons ; les pigeons présentent fréquemment sur la muqueuse buccale un *chancre* produit par l'Aspergillus, et Rénon a montré, qu'en ensemençant sur des milieux appropriés des graines de millet et de vesce, on obtient des cultures de diverses espèces d'Arpergillus et en particulier d'*Aspergillus fumigatus*. — Dans les lésions de l'homme, l'Aspergillus est fréquemment associé au Bacille de Koch.

§ 1er. — MALADIE EXPÉRIMENTALE.

Le pigeon, le lapin et le singe sont réceptifs ; le chien et le chat semblent réfractaires.

Le pigeon constitue l'animal de choix pour les inoculations. Les passages par le pigeon exaltent la virulence du parasite (Kotliar).

L'injection, dans la veine axillaire du pigeon, d'une culture en milieu de Raulin entraîne la mort de l'animal plus ou moins rapidement, suivant la quantité injectée : une dose de 2 à 3 centimètres cubes tue en quarante-huit à soixante-douze heures, une dose de 1 centimètre cube cause une maladie à marche lente se terminant par la mort au bout d'une quinzaine de jours.

Quand la mort survient de bonne heure, les lésions macroscopiques sont peu accusées, on ne trouve des tubercules que dans le foie ; les poumons et la rate paraissent simplement hyperémiés. Quand la maladie a une marche lente, on voit à l'œil nu de nombreux tubercules dans les viscères et notamment dans le foie ; ces lésions peuvent présenter tous les stades de l'évolution tubercu-

leuse typique (granulations miliaires, dégénérescence caséeuse, transformation fibreuse).

L'examen microscopique des organes permet de constater les lésions classiques de la tuberculose de Koch, mais dans tous les tubercules on trouve un feutrage épais de mycélium et de spores.

§ 2. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET RECHERCHE.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

L'*Aspergillus fumigatus* est constitué par un *mycélium* filamenteux d'où partent à angle droit des prolongements renflés en massues et portant les *spores*; ces spores sont arrondies, brunâtres ou verdâtres; leur diamètre atteint 3 à 4 μ. L'Aspergillus se colore bien par les couleurs d'aniline et prend le Gram.

CARACTÈRES DES CULTURES.

L'*Aspergillus fumigatus* se développe de préférence dans le liquide de Raulin ou le moût de bière; exclusivement aérobie, il cultive à partir de + 22°. Kotliar a montré que, dans les milieux de culture (bouillon, liquide de Raulin), l'*Aspergillus fumigatus* ne forme pas de toxines ni de substances vaccinantes.

Bouillon. — Culture très grêle apparaissant tardivement; flocons mycéliens dans le liquide clair; sporulation rare.

Liquide de Raulin. — Développement abondant; nombreux flocons dès la quinzième heure à 37°. Dans la culture, filaments enchevêtrés et très nombreuses fructifications.

Gélatine. — Développement tardif de minimes flocons le long de la strie; de rares spores apparaissent vers la quatrième semaine; à la longue il se produit une très légère liquéfaction.

Gélose. — Vers le deuxième jour à 37°, on observe un enduit blanc le long de la strie; peu à peu la culture prend une teinte verte qui se fonce progressivement.

Pomme de terre. — Strie abondante se développant rapidement et devenant vert noir.

RECHERCHE.

Crachats. — On recherche l'Aspergillus par l'examen microscopique et les cultures.

Examen microscopique. — Rénon recommande le procédé suivant : préparer des frottis avec les parties vertes des crachats et colorer en faisant agir pendant dix minutes une solution aqueuse de safranine; le mycélium et les spores sont teintés en orangé clair.

Ensemencement. — Prélever purement de petites parcelles au centre des crachats verdâtres et ensemencer ces parcelles dans des tubes contenant du liquide de Raulin.

Coupes. — Les coupes, pratiquées après durcissement à l'alcool et inclusion à la paraffine, sont colorées par la méthode de Gram ou par le procédé de Weigert modifié comme il suit :

1° Coloration au picrocarmin de Orth (p. 227).

2° Séjour de vingt minutes dans le violet de gentiane aniliné ou phéniqué.

3° Lavage rapide dans une solution de sel marin à 0,7 p. 100 ; enlever l'excès de liquide avec un morceau de papier filtre.

4° Faire agir pendant une minute le liquide de Gram, puis enlever le liquide avec du papier filtre.

5° Déposer sur la coupe quelques gouttes d'huile d'aniline ; laisser agir quelques instants.

6° Remplacer l'huile par du xylol ; absorber l'excès de liquide et monter dans le baume.

Article II. — ACHORION SCHOENLEINII.

Schœnlein a montré que le *favus* est causé par un champignon, l'*Achorion*.

L'*Achorion Schœnleinii* peut envahir tous les éléments épithéliaux ; on le rencontre dans le cuir chevelu (godet favique), la peau (favus des parties glabres), les ongles (ongles en moelle de jonc) ; dans une observation de Kaposi et Kundrat, le parasite avait envahi la muqueuse de l'œsophage, de l'estomac et de l'intestin. — Le cheveu favique émerge le plus souvent d'un *godet*, il est décoloré jusqu'à une faible distance de son émergence ; il s'épile en entier et ne casse pas sous la pince.

Dans le favus humain on pourrait rencontrer plusieurs variétés d'Achorion, très voisines les unes des autres ; Bodin en décrit cinq, Neebe et Unna, neuf. Beaucoup d'auteurs soutiennent, au contraire, l'unicité de l'Achorion.

Les tentatives d'inoculation aux animaux n'ont fourni que des résultats incertains.

Favus des animaux. — Les parasites du favus de certains animaux sont voisins de l'Achorion mais ne lui sont pas identiques. Le favus du chien est causé par l'*Oospora canina* (Costantin et Sabrazès), le favus de la poule par l'*Epidermophyton gallinæ* (Mégnin), celui de la souris par l'*Achorion Quinckeanum* ou *Achorion Arloingi* (Quincke).

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET RECHERCHE.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Placer sur une lame une goutte de solution de potasse caustique à 40 p. 100, y déposer la cheveu et recouvrir avec une lamelle.

Chauffer avec précaution sur la veilleuse d'un bec Bunsen jusqu'à commencement d'ébullition. Dès qu'une bulle s'est formée, arrêter la dissociation en posant la lame sur un corps froid et examiner immédiatement (oc. 1, obj. 8); le cheveu est éclairci et laisse voir le parasite.

Ces préparations sont très favorables à l'étude, mais elles ne se conservent pas. On obtient des préparations durables en faisant pénétrer, par capillarité, sous la lamelle des préparations à la potasse, une gouttelette de glycérine éosinée. Il ne faut jamais faire agir l'eau sur les cheveux traités par la potasse : ils se réduiraient immédiatement en une fine poussière

Dans les cheveux faviques traités par la potasse, on voit de nombreux filaments mycéliens sporulés ou non. Ces filaments sont placés suivant l'axe du cheveu, ils sont ténus, noueux, simples ou pourvus de deux à quatre ramifications. Les spores ont 3 à 7 μ de diamètre, elles sont arrondies ou légèrement aplaties par pression réciproque ; elles n'infiltrent pas la totalité du poil, mais y forment des chaînes ramifiées séparées les unes des autres.

Le parasite franchit les gaines épithéliales et pénètre dans le derme ; il détruit la papille pilaire et entraîne la chute du poil. Au niveau des godets faviques, il se produit une surproduction de cellules épithéliales au milieu desquelles on trouve le parasite agglutiné par une glaire amorphe.

Dans le poil, l'Achorion se caractérise par les particularités suivantes :

a. Il ne possède pas d'enveloppe visible; en réalité, il existe une enveloppe, mais elle est très réfringente et difficile à déceler.

b. Le mycélium a un aspect irrégulier, noueux, les filaments sont sinueux.

c. Le parasite n'infiltre jamais la totalité du poil.

d. Les filaments se divisent en trois ou quatre ramifications rappelant l'aspect des os du tarse de l'homme (*tarse favique*).

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — L'Achorion se distingue des autres moisissures en ce qu'il ne cultive pas sur les milieux acides (Duclaux et Verujski) : une acidité supérieure à 0gr,3 d'acide tartrique par litre arrête la culture. Il exige, pour se développer, des milieux riches en peptone ; les sucres lui conviennent fort mal, au contraire la glycérine (bouillon et gélose glycérinés) et la mannite sont pour lui des aliments de choix. Il est aérobie.

Son développement commence à + 15°, la température optima est de 33°; à 38° le développement s'arrête.

L'*Achorion Schœnleinii* n'existe pas à l'état pur dans les lésions faviques ; pour obtenir des cultures pures on a recours au procédé suivant : dans une cellule dépolie et stérilisée, on triture un fragment de godet favique avec un peu d'acide silicique pulvérulent et stérilisé ; on dissémine la poussière obtenue sur une plaque de gélatine en boîte de Petri ; on prélève les colonies qui se développent au niveau des points où a été déposée une seule spore.

Gélose. — Culture caractéristique : formation d'un enduit jaune brun plissé, irrégulier, déprimé au centre et rappelant l'aspect des godets faviques du cuir chevelu.

Bouillon. — A la surface se produit une grosse colonie très étalée qui flotte et prend l'aspect de la culture sur gélose.

Article III. — TRICOPHYTON TONSURANS.

Le Tricophyton a été découvert par Gruby et décrit par Malmsten.

Le Tricophyton produit des hyphes sporifères disposées en grappe et rentre par conséquent dans le groupe des Bothrytis. Il se développe sur le cuir chevelu (teigne tonsurante), la barbe (sycosis), la peau glabre (herpès circiné, folliculite agminée) et dans les ongles.

Cultures. — Comme l'Achorion, le Tricophyton ne pousse pas sur les milieux acides. Il affectionne les milieux contenant du sucre et peu de matières azotées, en particulier le moût de bière (180 p. 1 000 de maltose) et le liquide suivant (Sabouraud) :

Maltose..	3gr,80
Peptone........	0gr,75
Eau....,..	100 grammes.

Ce liquide peut être solidifié par addition de 14 p. 1 000 de gélose.

Ensemencements. — Pour obtenir des cultures de Tricophyton, on s'adresse à un poil malade, au contenu d'une vésicule d'herpès circiné ou à du sang recueilli au niveau des lésions.

1° *Ensemencement du sang.* — Prélever quelques gouttes de sang au niveau des parties malades, en opérant comme nous l'avons dit à propos de la pelade, et étaler ce sang sur des tubes de gélose de Sabouraud inclinés.

2° *Ensemencement du contenu des vésicules.* — Prélever purement, avec une très fine pipette ou une öse, le contenu d'une vésicule et l'étaler sur des tubes de gélose de Sabouraud.

3° *Ensemencement d'un cheveu.* — Le Tricophyton est mélangé dans les lésions à cinq ou six espèces commensales ; pour pratiquer l'isolement, Sabouraud conseille le procédé suivant :

Arracher un cheveu malade, le déposer sur une lame flambée et,

avec une aiguille coupante, le sectionner en autant de fragments que possible. Chaque fragment est transporté dans un milieu nutritif (moût de bière ou liquide de Sabouraud) contenant beaucoup de sucre et de peptone, milieu sur lequel les espèces commensales ne se développent pas. Faire deux à trois passages à 18° sur le même milieu, puis, prélever un fragment de la dernière culture, âgée d'environ vingt jours, et en faire un frottis sur une tranche de pomme de terre; on obtient ainsi des colonies isolées de Tricophyton.

VARIÉTÉS. — Sabouraud désigne le Tricophyton tonsurant de Malmsten sous le nom de *Tricophyton megalosporum*, pour écarter toute confusion avec un autre champignon à petites spores, le *Microsporum Audouini*, qui cause lui aussi une teigne et que nous étudierons plus loin. Dans l'espèce *Tricophyton megalosporum*, Sabouraud distingue deux variétés :

A. — TRICOPHYTON ENDOTHRIX.

Le *Tricophyton endothrix* se développe à l'intérieur du cheveu. Le cheveu atteint est cassé très court, il est plus gros que les cheveux sains et ne présente pas de collerette; il est très difficile à épiler ; parfois il est décoloré.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

L'examen microscopique, pratiqué sur un cheveu traité par la potasse (Voy. p. 584) ou dissocié dans une goutte d'acide acétique et monté dans la glycérine, montre que ce cheveu est rempli de spores très nombreuses, disposées en chaînettes, et de filaments mycéliens peu abondants. Le parasite se reconnaît aux caractères suivants :



Fig. 238. — *Tricophyton megalosporum.* — Cheveu (Reich. ; Obj. 8 ; Oc. II).

a. Les spores ont 5 à 6 μ de diamètre; elles sont rondes ou cubiques à angles émoussés et forment des chapelets.

b. La totalité du cheveu est envahie par les spores.

c. Les filaments mycéliens présentent au plus deux bifurcations, jamais on ne constate l'aspect du tarse favique.

Certains Tricophytons se laissent facilement dissocier; d'autres, au contraire, résistent à l'action de la potasse.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Le *Tricophyton endothrix* forme à la surface des milieux de culture un tapis feutré, continu, de couleur crème, avec des nervures rayonnant du centre à la périphérie. Parfois, le centre de la culture se creuse en un godet entouré d'une zone poudreuse et brunâtre.

Dans les cultures en milieux maltosés, le Tricophyton donne un mycélium avec hyphes sporifères en grappes; dans les milieux peptonisés ordinaires, le développement est peu intense et l'on obtient l'aspect observé chez l'homme.

INOCULATIONS.

L'inoculation est difficile à réussir chez l'homme, à cause de l'acidité des sécrétions cutanées, acidité qui s'oppose au développement du parasite (Verujsky). Pour réussir l'inoculation, il faut rendre la sueur alcaline en administrant au patient 15 à 20 grammes de bicarbonate de soude; on peut encore brûler un point de la peau en y appliquant la pointe rouge d'une allumette qui vient de s'éteindre : il se forme une petite vésicule contenant un liquide neutre; le lendemain on inocule le parasite à l'intérieur de la vésicule.

L'inoculation du *Tricophyton endothrix* réussit très difficilement chez les animaux (cobaye, lapin, chat). La lésion guérit spontanément en cinq à six semaines.

B. — TRICOPHYTON ECTOTHRIX.

Le *Tricophyton ectothrix* est d'origine animale (cheval); il produit chez l'enfant la teigne dite *Kérion de Celse* et chez l'adulte le *sycosis* et la *tricophytie unguéale.* Le *Tricophyton ectothrix* est pyogène ; les lésions qu'il provoque s'accompagnent de dermite.

Le cheveu atteint est cassé et légèrement replié sur lui-même à son extrémité libre, ce qui donne à la plaque de teigne un aspect irrégulier caractéristique.

Le parasite se développe au dehors du cheveu et forme une collerette autour de la portion radiculaire de celui-ci ; la gaine épidermique est pénétrée plus que le cheveu lui-même.

EXAMEN MICROSCOPIQUE.

Pour la recherche du parasite, on doit s'adresser, non aux poils adultes, mais aux petits poils follets qu'on rencontre à la périphérie des lésions. Le poil follet, enlevé avec le cône épidermique dont

émerge, est examiné après action de la potasse ; les filaments sporulés forment une masse compacte dans la gaine épidermique du poil. Les spores sont en général plus grosses que dans le *Tricophyton endothrix*, quelques-unes peuvent atteindre 15 à 18 μ de diamètre.

Quand on échoue à déceler le parasite sur les poils, on prend le pus d'une vésicule non encore ouverte et on en examine une gouttelette sans coloration. Dans ce pus, on observe un petit nombre de filaments sporulés présentant les mêmes caractères que ceux des poils ; en éclairant fortement avec le condensateur Abbé, on voit entre les globules du pus une quantité de débris mycéliens très grêles et très courts qui avaient passé inaperçus à l'examen à la lumière ordinaire. Il est difficile d'obtenir des préparations colorées satisfaisantes; la fuchsine et l'éosine donnent les meilleurs résultats.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Sur le moût de bière gélosé, milieu de choix, la culture forme d'abord une fine houppe duveteuse, blanche, qui s'accroît et s'entoure de rayons étoilés; puis, vers le huitième jour, elle se couvre d'une poussière blanche, plâtreuse; vers le quinzième jour, reparaît au centre une houppe de duvet.

Toujours les cultures sont blanches; ce caractère est important, les Tricophytons à cultures blanches étant tous pyogènes.

Le *Tricophyton ectothrix* peut vivre à l'état de saprophyte; il cultive aisément sur le terreau, les feuilles de mûrier, etc.

INOCULATIONS.

Le *T. ectothrix* est inoculable à l'homme et au cobaye. L'inoculation au cobaye est facile: il suffit de prendre un peu de la culture sur une pince à griffes et de pincer la peau de l'animal avec l'instrument.

Article IV. — **MICROSPORUM AUDOUINI.**

Le *Microsporum Audouini* a été découvert par Gruby dans une affection parasitaire des cheveux, qu'il nomma *prurigo decalvans* et qui fut, depuis, confondue avec les pelades et la tricophytie.

Sabouraud a fixé l'entité pathologique de la teigne de Gruby qu'il désigne sous le nom de *teigne tondante rebelle* ou de *teigne tondante de Gruby*. Le parasite de cette affection doit conserver le nom de *Microsporum Audouini* et non prendre celui de *Tricophyton Microsporum* que Sabouraud lui avait attribué au début de ses recherches; il diffère entièrement des Tricophytons.

Le *M. Audouini* ne se développe jamais sur la peau glabre; il

atteint les seuls cheveux. Ceux-ci ont un aspect spécial ; ils se cassent à 6 ou 7 millimètres de la peau, sont très fins, décolorés et revêtus d'une gaine d'apparence épidermique, unie, grise, formée par le parasite ; les parties atteintes semblent saupoudrées d'une poussière bleue.

EXAMEN MICROSCOPIQUE.

Les cheveux traités par la potasse (Voy. p. 584) se montrent recouverts par une mosaïque de spores ayant 1 à 3 μ de diamètre, rondes ou polyédriques par pression réciproque, agglomérées sans ordre, jamais disposées en chaînettes et possédant une enveloppe claire et transparente. Les spores ne pénètrent jamais à l'intérieur du cheveu. Entre les spores, on voit de rares filaments mycéliens très courts, sigmoïdes (fig. 239). — Le *Microsporum Audouini* se développe de haut en bas sur le cheveu ; il s'enfonce d'autant plus profondément autour de la portion radiculaire que la lésion est plus ancienne.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Le cheveu, déposé sur une lame de verre stérile, est coupé en petits fragments dont chacun est porté dans un des milieux utilisés pour le Tricophyton ; le plus souvent on obtient une culture pure dès le premier ensemencement.



Fig. 239. — *Microsporum Audouini*. — Cheveu (Reich. ; Obj. 8 ; Oc. II).

Pomme de terre. — *Culture caractéristique*. — Au bout de sept à huit jours, strie grisâtre puis brun rougeâtre. Vers le dixième ou douzième jour, apparaît sur cette strie un duvet rare, court, formant par places de petits bouquets.

La culture sur pomme de terre garde plusieurs mois sa vitalité ; dans les mêmes conditions le Tricophyton meurt en dix-huit jours.

Moût de bière gélosé. — Au bout de trois à quatre jours, touffes de mycélium radié pénétrant dans la gélose et prenant l'apect soyeux des graines de peuplier ; puis, du centre de la colonie, émerge une touffe de rameaux aériens duveteux, en même temps qu'il se forme

autour de la culture des cercles concentriques glabres devenant légèrement duveteux à la longue. La culture est blanche.

Dans ces cultures, les filaments mycéliens sont d'abord courts, puis ils s'allongent, s'intriquent et se renflent en massue. Au bout de quelques jours, les terminaisons mycéliennes émettent de longs filaments contournés en lanières de fouet et sur lesquels apparaissent les hyphes sporifères en forme de peignes dont chaque dent porte une spore; ce mode de sporulation distingue absolument le *Microsporum* du Tricophyton.

INOCULATIONS.

Le *Microsporum Audouini* est inoculable au cheval; une variété de *Microsporum* cause l'ulcère contagieux vulgaire des jeunes chevaux. La longue durée et la contagiosité de la teigne de Gruby ne permettent pas de tenter l'inoculation à l'enfant, dont le cuir chevelu constitue le terrain le plus favorable à l'évolution du parasite.

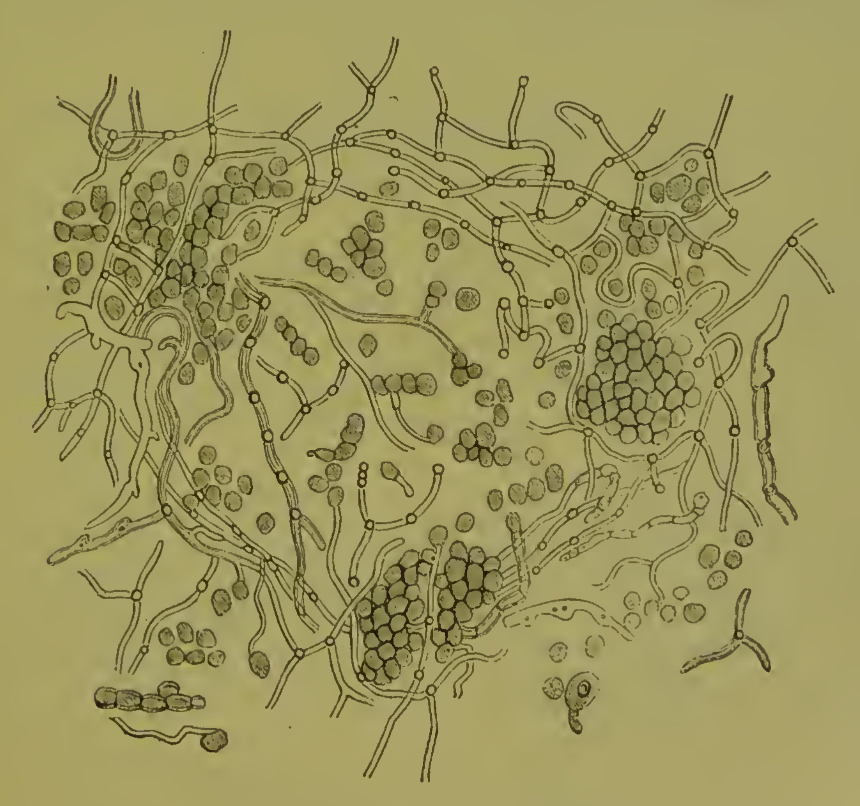


Fig. 240. — *Microsporum furfur.*

Article V. — MICROSPORUM FURFUR.

Le *Microsporum furfur*, découvert par Eichstedt, est le parasite du *pityriasis versicolor*.

Recherche. — Pour rechercher le *M. furfur*, on détache, par raclage avec une lame peu tranchante, des squames épithéliales au niveau d'une plaque de pityriasis. Ces squames sont traitées, sur la lame porte-objet, par la potasse à 40 p. 100 et examinées dans ce liquide; on peut encore traiter les squames par l'acide acétique, puis les monter dans de la glycérine teintée par l'éosine.

Dans les interstices des cellules épithéliales dissociées on voit les amas formés par le parasite; ces amas sont constitués par des *spores* et des *filaments mycéliens* (fig. 240). Les spores sont discoïdes, leur aspect rappelle celui d'un globule sanguin; elles possèdent un noyau volumineux occupant la presque totalité de la cellule et entouré d'un protoplasma granuleux enveloppé lui-même d'une enveloppe cellulosique.

Les filaments mycéliens sont courts, peu flexueux, souvent contournés en V, peu ramifiés et quelquefois placés bout à bout; chaque cellule présente un noyau.

Le développement du *Microsporum furfur* est encore inconnu.

Article VI. — MICROSPORUM MINUTISSIMUM.

Burchardt a décrit, sous le nom de *Microsporum minutissimum*, le parasite de l'*érythrasma*.

Recherche. — On appliquera à la recherche du *Microsporum minutissimum* les mêmes procédés que pour celle du *Microsporum furfur*. Le parasite est constitué par des filaments mycéliens longs, flexueux, enchevêtrés, rarement ramifiés, divisés en segments placés bout à bout, et par de nombreux amas de spores très fines. Le mode de développement est mal connu.

D'après De Michele, le *M. minutissimum* cultive facilement sur les milieux ordinaires; sur gélatine il produit un enduit brunâtre; sur pomme de terre, une culture rouge vineux. Les cultures sont inoculables à l'homme après grattage de la peau avec une lancette. Ducrey et Reale attaquent les conclusions de De Michele: les cultures de cet auteur ne se rapporteraient pas au parasite de l'érythrasma, celui-ci cultiverait très difficilement entre 25° et 30° sur les milieux ordinaires, la culture serait blanche sur gélatine et gélose, rouge brun sur pomme de terre.

MOISISSURES SAPROPHYTES.

Un certain nombre de moisissures sont susceptibles de se développer sur les aliments et en particulier sur le pain. L'ingestion d'aliments ainsi altérés peut déterminer des phénomènes d'intoxication; nous passerons en revue les moisissures que l'on rencontre le plus fréquemment.

Examen microscopique. — Il demande certaines précautions; le procédé le plus simple consiste à détacher avec des ciseaux fins un fragment de la moisissure et à le porter dans une goutte d'alcool sur la lame porte-objet (ne pas employer l'eau qui mouille mal le végétal et fait éclater les sporanges); puis on recouvre la préparation avec une lamelle et on remplace l'alcool par de la glycérine qu'on fait pénétrer par capillarité (la goutte de glycérine étant déposée sur un des bords de la lamelle, on absorbe l'alcool au bord opposé avec un morceau de papier filtre). — On peut encore placer la moisissure sur la lame porte-objet dans une goutte de solution d'acide osmique à 0,5 p. 100; on laisse en contact quelques minutes; on lave à l'alcool, à l'eau distillée et on monte dans une goutte de glycérine; on colorerait la préparation en faisant agir une solution aqueuse de safranine, après l'acide osmique.

Pour examiner une colonie entière, Salomonsen recommande le procédé suivant: Prendre une colonie peu développée, la placer sur la lame et la recouvrir doucement d'une lamelle; laisser sécher pendant quelques minutes, puis déposer sur un des bords de la lamelle une grosse goutte de la solution d'acide osmique; au bout de quelques minutes, quand le liquide a bien imprégné la préparation, l'absorber avec un morceau de papier filtre et le remplacer par de l'eau, substituer enfin à l'eau un peu de glycérine.

Cultures. — Les moisissures se développent de préférence sur les milieux acides; on les cultive aisément sur des tranches de fruits ou de pommes de terre. On peut encore les cultiver sur des morceaux de pain stérilisés. Pour cela on coupe de petits fragments de pain sur un des côtés desquels on conserve la croûte et on introduit ces fragments dans des tubes à pomme de terre au fond desquels on a mis un peu d'eau. On bouche à l'ouate et on stérilise à 115°-120°.



Fig. 241. — *Penicillium glaucum.*

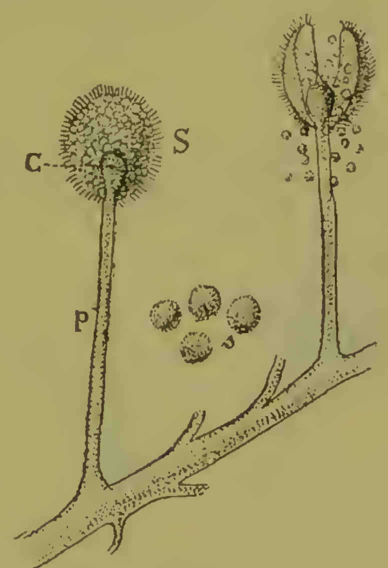


Fig. 242. — *Mucor mucedo.*

Penicillium.

P. glaucum est une des moisissures les plus fréquemment rencontrées; il forme des taches vertes sur le pain et la pomme de terre. Il est constitué par un mycélium ramifié portant des kystes sporifères sur lesquels les spores forment des chaînettes groupées en aigrettes.

MUCOR.

Mucor mucedo est très fréquemment rencontré; le développement est abondant et donne lieu à la formation de hautes touffes blanchâtres analogues à des flocons d'ouate. Du mycélium rameux s'élèvent de hautes tiges sporifères ou *pédicelles* renflées en *columelles*. Autour de la columelle se développe une *sporange* volumineuse, hérissée (S, fig. 242), qui s'ouvre en boîte à savonnette et met en liberté des spores sphériques.

RHYZOPUS.

R. nigricans ou *Ascophora nigricans*, espèce dangereuse d'après Mégnin et



Fig. 243. — *Rhyzopus nigricans.*

dont relèveraient la plupart des accidents produits par l'ingestion d'aliments moisis. — Taches noirâtres constituées par un mycélium très abondant, très ramifié, portant des hyphes sporifères terminées par des sporanges globuleuses (S, fig. 243) s'ouvrant, par éclatement et renversement de la membrane d'enveloppe, pour mettre en liberté des spores sphériques, hérissées.

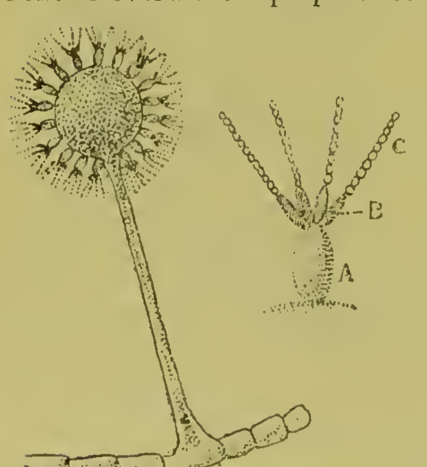


Fig. 244. *Stérygmatocyste niger.*

STÉRYGMATOCYSTE.

St. niger. Taches noirâtres constituées par un mycélium à filaments courts, associés bout à bout, et portant des hyphes dont l'extrémité libre, renflée en boule, donne attache à des *cellules basilaires* (A, fig. 244); chacune de ces dernières porte trois à quatre cellules dites *en doigt de gant* (B), supportant les chaînettes de spores (C).

Aspergillus.

A. flavus; *A. glaucus*. Ce genre se distingue du précédent en ce que le renflement de l'hyphe sporifère porte directement les cellules en doigt de

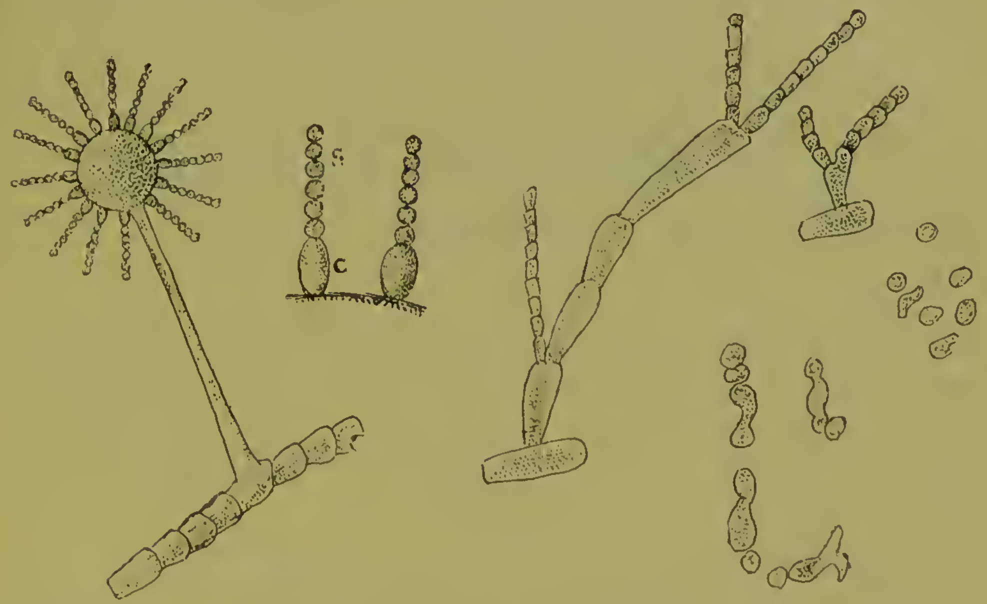


Fig. 245. — *Aspergillus glaucus*.

Fig. 246. — *Oïdium lactis*.

gant sans interposition de cellules basilaires. La sporange rappelle l'inflorescence de l'oignon.

Oïdium.

O. lactis. — Taches grisâtres, muqueuses. Cellules allongées placées bout à bout; les cellules terminales des chaînes portent des colonnettes de spores; de nombreuses cellules sont en voie de bourgeonnement.

CHAPITRE XXXV

LES PROTOZOAIRES PARASITES AMŒBIENS

Depuis quelques années les Protozoaires ont pris une grande importance en pathologie humaine et vétérinaire. Les protozoaires parasites des animaux sont mieux connus et paraissent infiniment plus nombreux que ceux qui sont susceptibles de causer des maladies chez l'homme.

Dans ce chapitre et les suivants nous laisserons de côté tout ce qui a rapport à la classification des protozoaires, renvoyant pour cela le lecteur aux travaux de Balbiani, Bütschli, Laveran, Raphael Blanchard, Labbé, Mesnil, etc. Nous nous bornerons à décrire brièvement les espèces pathogènes en indiquant les procédés qui conviennent à leur recherche et à leur étude.

Parmi les *Rhyzopodes*, les *Amibes* constituent les seuls êtres intéressants au point de vue de la pathologie. On a attribué la dysenterie à l'*Amœba coli* ; on a également signalé la présence d'Amibes dans des ulcérations buccales, dans le tartre dentaire (*Amœba buccalis*; Gross, Sternberg, Kartulis), dans des hématuries, des cystites et des métrites (*Amœba urogenitalis*, vel *vaginalis*; Bœltz, Kartulis, Wijnhoff, Rossi Doria).

Avant d'aborder la recherche et l'étude des Amibes pathogènes, nous conseillons de se familiariser avec l'observation des Amibes en utilisant une espèce saprophyte très répandue, l'*Amœba princeps*.

AMŒBA PRINCEPS.

Amœba princeps est très facile à observer. On se la procure aisément en laissant macérer un peu de paille dans un vase plein d'eau. Dans une telle infusion on constate au bout de peu de jours, à côté de très nombreuses bactéries et de divers autres protozoaires, des masses de protoplasma granuleux, pouvant atteindre jusqu'à 100 μ de diamètre, et qui constituent les Amibes.

L'Amibe ne possède pas de membrane d'enveloppe; dans son protoplasma existe une masse arrondie, très réfringente, rendue très apparente par l'action de l'acide acétique, c'est le noyau. Le picro-carminate d'ammoniaque teinte faiblement le protoplasma et colore fortement le noyau. Le protoplasma est granuleux, sauf à la périphérie où il paraît plus clair et dépourvu de granulations ; il contient une vacuole contractile.

L'Amibe a la propriété de modifier sa forme par l'émission et la rétraction de pseudopodes. De la production des pseudopodes dépend la préhension des aliments et aussi la mobilité de l'Amibe : l'Amibe est, en effet, très mobile, elle se déplace lentement par des modifications successives de sa forme ; quand un pseudopode arrive au contact d'une particule solide, il l'entoure, l'englobe et la particule passe à l'intérieur du protoplasma. Si le corps ingéré est propre à servir de nourriture à l'animal, il se dissout peu à peu dans le protoplasma ; s'il n'est pas apte à être digéré, il est bientôt rejeté au dehors. La digestion intracellulaire s'accompagne d'une sécrétion acide au sein du protoplasma (Metchnikoff).

La figure 247 représente les diverses formes prises par une *Amœba*

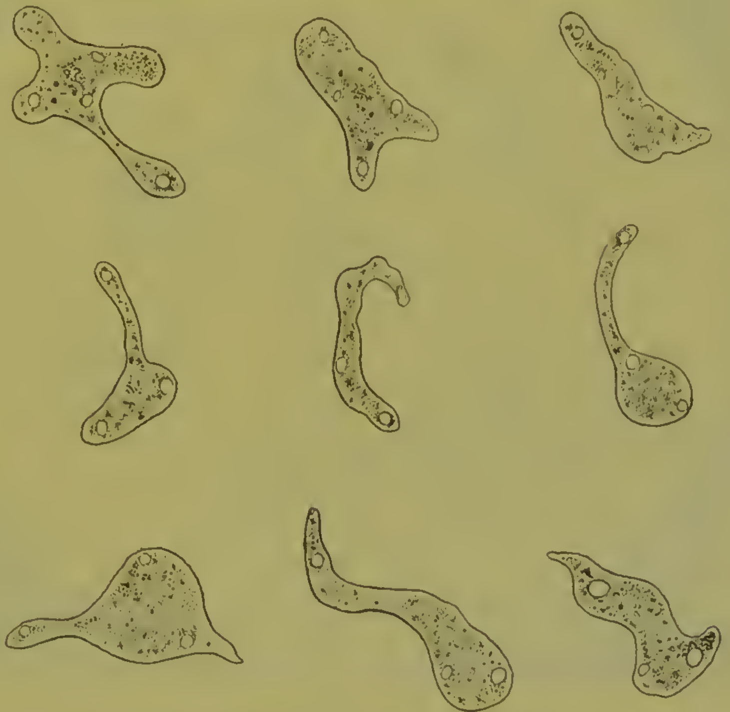


Fig. 247.— *Amœba princeps.* — Différentes formes prises par l'animal, en se déplaçant, sous le champ du microscope. (Durée de l'observation : 35 minutes.)

princeps sous le champ du microscope pendant une période d'observation de trente-cinq minutes.

L'Amibe se reproduit par simple division : elle se divise en deux et la bipartition du noyau paraît précéder celle du protoplasma.

Quand le milieu où se trouvent les Amibes vient à se dessécher, celles-ci s'enkystent pour vivre d'une vie latente ; elles perdent leur enveloppe protectrice et reprennent leurs caractères quand elles se trouvent replacées dans des conditions favorables. — Une température de + 40° environ tue rapidement l'*Amœba princpes.*

AMŒBA COLI.

Amœba coli a été rencontrée par Lösch dans les selles d'un homme atteint d'une affection ulcéreuse de l'intestin; Koch, Hlava, etc., la décrivirent dans l'intestin des dysentériques; Nasse, Osler l'ont rencontrée dans des abcès dysentériques du foie ; Kartulis s'est fait le défenseur de l'étiologie amibienne de la dysenterie, sa manière de voir a trouvé des partisans (Councilman, Lafleur, Simon, Hlava, Kovacz, etc.) et des détracteurs (Tancarat, Quincke et Roos, Massiutin, Wilson, etc.). Il nous suffira de dire que :

1° La présence des Amibes n'est pas constante chez les dysentériques.

Laveran trouve une fois seulement des Amibes sur 10 cas de dysenterie, Kruse et Pasquale 10 fois sur 35 cas, Gasser 45 fois sur 105 cas, nous-même 2 fois sur 12 cas, Kartulis 18 fois sur 35 cas, etc.

2° On rencontre les Amibes dans des affections autres que la dysenterie et chez l'homme sain.

Quincke et Roos, chez l'homme sain, dans les selles diarrhéiques produites par l'ingestion d'un purgatif salin, ont trouvé des Amibes 9 fois sur 21 observations. Dans les fèces d'hommes parfaitement sains, Gasser, Wilson et nous-même avons pu rencontrer des Amibes. — D'autre part, Sanarelli a vu, chez des cobayes ayant succombé à l'entérite toxique produite par l'ingestion de toxine cholérique, le contenu intestinal contenir des Amibes en nombre considérable ; pour lui les Amibes pulluleraient dans l'intestin de ces animaux dans tous les cas d'entérite toxique.

Aspect microscopique. — *Amœba coli* ressemble beaucoup à *Amœba princeps* et encore plus à un autre protozoaire très répandu dans les milieux extérieurs, *Amœba jelaginia* (Mereschowski).

Elle se présente dans les selles sous la forme de masses protoplasmiques de 20 à 60 μ de diamètre, affectant d'ordinaire une forme elliptique ou arrondie et n'émettant qu'un seul pseudopode.

Les mouvements sont excessivement lents; l'animal ne parcourt guère en une minute qu'une distance égale à sa longueur.

Le protoplasma granuleux contient un noyau arrondi, muni d'un nucléole, et une ou plusieurs vacuoles ; on y rencontre fréquemment des corps étrangers : globules du sang, grains d'amidon, etc. — Les Amibes rencontrées dans l'intestin par les divers auteurs semblent appartenir à plusieurs espèces.

Recherche. — La recherche de l'*Amœba coli* exige certaines précautions : les selles doivent être examinées aussitôt après leur émission, alors qu'elles sont encore chaudes; l'examen sera fait de préférence sur une platine chauffante (Voy. p. 131). Quand les matières fécales sont solides, elles doivent être diluées pour l'examen ; la dilu-

tion sera pratiquée, non dans l'eau, mais dans une solution tiède de chlorure de sodium à 7 p. 1000 ou mieux encore dans le liquide de Grassi fraîchement préparé :

Albumine	0gr,20
Chlorure de sodium	1 gramme.
Eau	200 grammes.

L'examen doit être pratiqué à l'état frais, sans coloration; la gouttelette de matière liquide est déposée sur une lame et recouverte

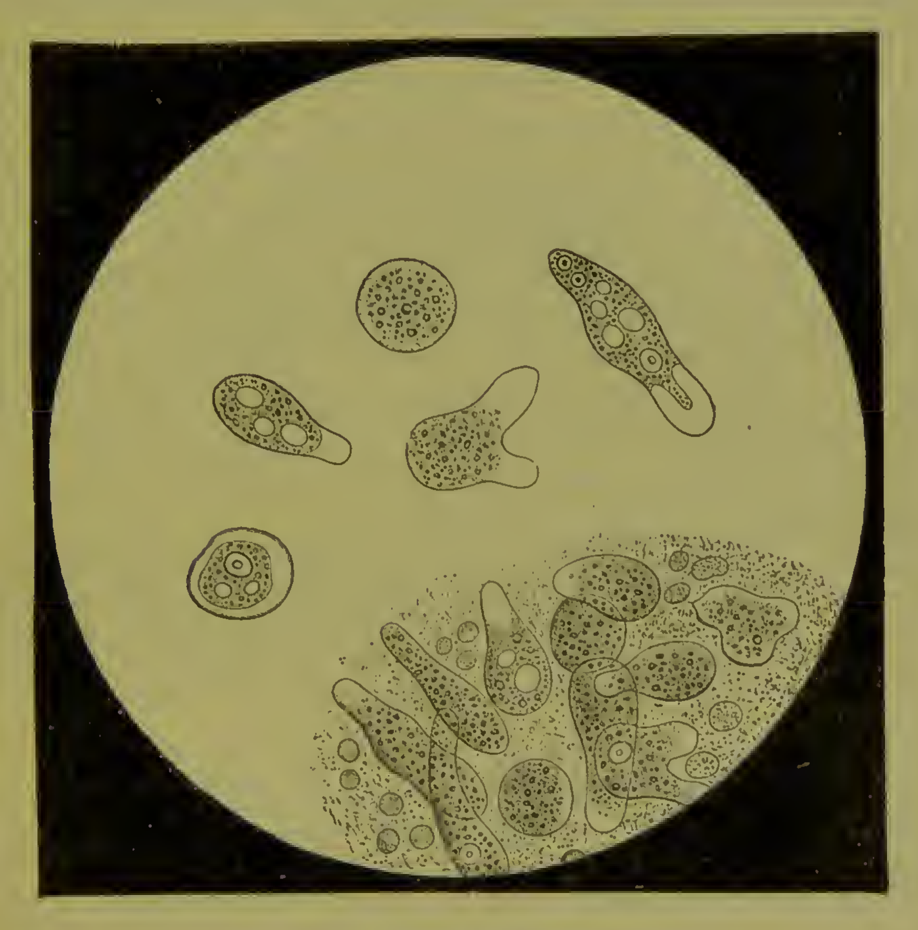


Fig. 248. — *Amœba coli* (d'après Lösch).

avec une lamelle. A côté des Amibes on voit quelques kystes dont le nombre augmente à mesure que les selles se refroidissent.

On peut fixer les Amibes en faisant pénétrer sous la lamelle, par capillarité, une goutte d'une solution d'acide chromique à 1 p. 100; après fixation, on colore les Amibes en faisant passer sous la lamelle une goutte de carmin aluné.

Cultures. — On n'a pas réussi à cultiver *Amœba coli.*

Kartulis obtenait des cultures en ensemençant un peu de matières fécales dans une infusion de paille, mais les Amibes ne se développaient qu'à la condition que les flacons ne fussent pas bouchés, même à l'ouate; comme le fait remarquer Schubert, de telles cultures n'ont aucune valeur, les Amibes qui s'y développent ne sont que des impuretés apportées par les poussières atmosphériques.

Inoculation. — Les résultats fournis par les inoculations ont peu d'intérêt, étant donné qu'on ne peut inoculer de cultures pures. Le chat et le chien sont les animaux les plus favorables aux expériences, mais les résultats que l'on a obtenus en leur inoculant des selles dysentériques ne sont pas concluants.

Lösch introduit dans le tube digestif de quatre chiens des selles dysentériques fraîches; un seul animal présente des Amibes dans les selles dès le huitième jour, mais il reste en bonne santé; il est sacrifié le dix-huitième jour, et l'on trouve la muqueuse rectale enflammée et ulcérée par places, les Amibes pullulaient au niveau des ulcérations.

Kovacz a réussi à donner une diarrhée sanguinolente au chat en lui injectant dans le rectum des selles dysentériques. — Kartulis a obtenu le même résultat avec une de ses cultures en infusion de paille. — Zancarol a produit la dysenterie chez le chat (injection rectale) avec des selles contenant des Amibes, mais aussi avec du pus d'abcès du foie ne contenant que des Streptocoques, et même avec des cultures pures de Streptocoque.

Le chat, d'ailleurs, présente fréquemment une colite ulcéreuse dysentériforme (Gasser); il en est de même du chien : nous avons observé à Tunis plusieurs chiens atteints de cette colite et nous n'avons pas trouvé d'Amibes dans leurs déjections. Chez le chat, l'injection rectale de substances irritantes, et particulièrement de terre stérilisée, produit des ulcérations du côlon.

Nous avons tenté de donner la dysenterie au chien par ingestion de matières dysentériques : les animaux recevaient avec la sonde œsophagienne une solution alcaline (bicarbonate de soude, 5 grammes; eau, 50) pour neutraliser le suc gastrique, et immédiatement après des doses de 10 à 250 centimètres cubes de selles dysentériques; de ces selles, les unes contenaient des Amibes, les autres s'en montraient dépourvues. Aucune de nos tentatives n'a été suivie de succès.

CHAPITRE XXXVI

LES PROTOZOAIRES PARASITES (SUITE) SPOROZOAIRES

Les *Sporozoaires* sont, au point de vue médical, les plus intéressants des protozoaires; ils vivent à l'état parasitaire chez un grand nombre d'espèces animales. A l'état adulte, ils sont constitués par un protoplasma nucléé entouré d'une cuticule; lors de la reproduction, ils se divisent en *spores* dont chacune donne naissance à un ou plusieurs *sporozoïtes* qui assurent la dissémination et la multiplication de l'organisme.

ARTICLE I. — LES MICROSPORIDIES.

Parmi les Microsporidies on ne connaît aucun parasite humain; c'est à ce groupe qu'appartient l'agent de la pébrine des vers à soie, le *Microsporidium bombycis*.

MICROSPORIDIUM BOMBYCIS.

Cornalia a signalé la présence, dans les vers à soie atteints par la pébrine, de corpuscules brillants, ovalaires, réfractaires aux réactifs chimiques; ces *corpuscules de Cornalia* ou *corpuscules vibrants*, bien connus depuis les travaux de Pasteur et de Balbiani, sont les agents de la maladie.

Microsporidium bombycis est le plus petit de tous les protozoaires : il ne mesure que 4 μ de long sur 2 de large. Il est constitué par une membrane d'enveloppe et un contenu qui s'échappe au moment de la reproduction. Les corpuscules sont tantôt ovoïdes, tantôt piriformes; ils ne possèdent pas de noyau, mais on y voit une vacuole placée vers l'une des extrémités (*capsule polaire*); parfois il existe une capsule à chacune des deux extrémités.

Pour étudier le développement du *Microsporidium bombycis*, Balbiani indique le procédé suivant : un papillon de ver à soie corpus-

culeux est broyé dans un mortier avec un peu d'eau ; avec la bouillie obtenue on badigeonne des feuilles de mûrier que l'on donne comme nourriture à de jeunes vers longs de quelques millimètres seulement. Au bout de quelques jours les vers sont infestés. Les spores se répandent dans le tube digestif et s'introduisent dans les parois de l'intestin où elles produisent de petites masses sarcodiques de dimensions variables, allongées dans le sens des fibres longitudinales de la tunique musculaire. Pour la formation de ces masses sarcodiques, les spores se percent par un bout et leur contenu protoplasmique s'échappe sous la forme d'un petit globule qui présente des mouvements amiboïdes et grossit dans les tissus ambiants.

Quand les masses sarcodiques ont pris un certain degré de développement, on voit apparaître à leur intérieur de petits globules pâles qui se transforment en corps ovalaires ou piriformes : ce sont là de jeunes spores qui ne tardent pas à être mises en liberté par la résorption de la masse sarcodique ambiante; ces spores se propagent et vont se développer dans tout l'organisme où elles donnent naissance à de nouvelles masses sarcodiques. C'est ainsi que le parasite franchit les parois du tube digestif et pénètre les glandes séricigènes, les vaisseaux de Malpighi, etc. Pendant l'état de chrysalide, l'envahissement se continue et se propage aux organes nouveaux qui appartiennent en propre au papillon : le parasite pénètre dans

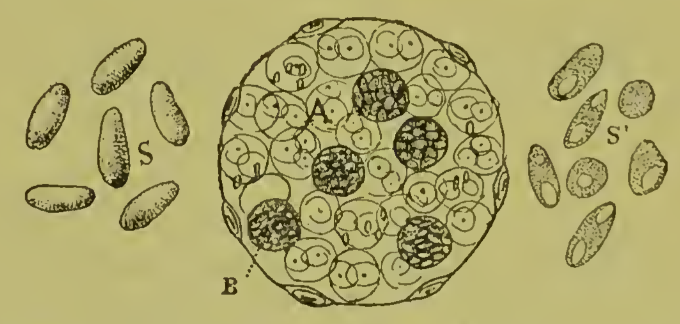


Fig. 249. — *Microsporidium bombycis.* — B, amas de Microsporidies dans un follicule du testicule du ver à soie. — S, spores à l'état de maturité parfaite. — S', spores incomplètement développées (d'après Balbiani).

les organes de la reproduction, infecte les faisceaux spermatiques, les ovules et se transmet ainsi aux nouvelles générations.

Recherche. — Les Microsporidies résistent très énergiquement aux agents chimiques. On les observera de préférence à l'état frais, sans coloration, avec l'objectif à sec 8 ou 9. Elles se colorent en violet par le *procédé de Vlacovich* : faire agir pendant quarante-huit heures une solution de potasse à 30 p. 100, traiter ensuite par le liquide de Gram et examiner dans une goutte d'acide acétique cristallisable.

Article II. — LES MYXOSPORIDIES.

Les Myxosporidies vivent à l'état parasitaire chez les poissons, les reptiles, les arthropodes, etc. Elles se développent dans la peau, les branchies, les viscères ; seul le système nerveux paraît en être toujours exempt.

Recherche. — On recherche de préférence les Myxosporidies dans les petites pustules saillantes qui se développent sur les téguments, les kystes sanguins qui se forment sur les ramifications de l'artère splénique (tanches), les kystes des lamelles branchiales, à la surface de la vessie urinaire, de la vessie natatoire, dans la rate, le foie, etc.

Pour l'examen, on prélève un petit kyste de 2 à 6 millimètres de long et on le transporte sur le porte-objet ; vu sans coloration à l'état frais, le kyste paraît constitué par une membrane d'enveloppe et un contenu. L'enveloppe est assez épaisse, résistante et amorphe ; le contenu est constitué par une substance plus ou moins liquide (colorée par de l'hématoïdine dans les kystes artériels) et renfermant des granulations diverses et des parasites à différents degrés de développement.

Les coupes d'organes (foie, rein, etc.) seront colorées à la thionine phéniquée, à l'éosine, au bleu de méthylène ou à la safranine.

Morphologie. — Les parasites sont très variables quant à la taille (65 à 300 μ) ; leur forme est le plus souvent arrondie, leur protoplasma est finement granuleux ; ils possèdent des mouvements très lents et qui ne sont appréciables que quand on pratique l'examen non dans l'eau, mais dans l'urine de poisson.

Dans les Myxosporidies ainsi constituées apparaissent, à un moment donné, de petits éléments arrondis contenant un ou deux noyaux, ce sont les *sphères primitives* dans lesquelles se forment les *spores* (Laveran). Chaque sphère donne deux spores et des granulations graisseuses colorables par l'acide osmique. Les spores ont une structure compliquée et variable suivant les espèces ; leurs dimensions vont de 8 à 36 μ ; elles sont constituées par une membrane d'enveloppe et un contenu. La membrane d'enveloppe est formée par deux valves, appliquées l'une sur l'autre comme les deux moitiés de la coquille d'une noix, homogènes et transparentes. A l'un des pôles de la spore, le contenu présente une à quatre vésicules, *capsules polaires*, colorables par le bleu de méthylène, la thionine, la safranine, et s'allongeant en un petit canal qui vient se fixer à la paroi, au pôle ; à cet endroit on voit une ouverture très fine qui met la spore en rapport avec l'extérieur.

A l'intérieur de chaque capsule polaire existe un filament enroulé en spirale et très difficile à voir; mais, vient-on à traiter la préparation par une goutte de glycérine ou de solution de potasse, les filaments se déroulent subitement et sortent à l'extérieur; ces filaments sont parfois très développés et peuvent atteindre huit à dix fois la longueur de la spore (fig. 251). En dehors de ces vésicules, le contenu de la spore, constitué par un protoplasma homogène, contient un noyau situé à la partie moyenne et colorable par la safranine.

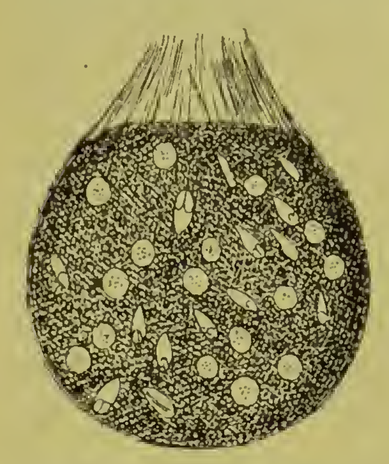


Fig. 250. — Myxosporidie de la tanche. — Kyste développé aux dépens de la tunique conjonctive de l'artère mésentérique et contenant des Myxosporidies (d'après Balbiani).



Fig. 251. — Myxosporidie de la tanche. — Corpuscule de Malpighi contenant des Myxosporidies. — Formes diverses de spores contenues dans le corpuscule; en haut : spores incomplètement développées, à l'état de masses amiboïdes ou de vésicules granuleuses; — à droite : spores complètement développées (d'après Balbiani).

Pour la reproduction, les spores mûres s'ouvrent par déhiscence des valves pour livrer passage à leur contenu, masse amiboïde qui forme directement une Myxosporidie (Balbiani).

Les recherches de Thélohan et Hofer sur les Myxosporidies des poissons, celles de Laveran sur le *Myxidium Danilewsky* (parasite de *Cistudo Œuropæa*) tendent à prouver que l'infestation se fait par les voies digestives.

Myxosporidies et Coccidies. — Laveran a décrit chez le goujon (*Gobio fluviatilis*) une Coccidie, *Coccidium Metchnikowi*, qui a des rapports intéressants avec une Myxosporidie, *Myxobulus oviformis*. Chez les animaux infestés par la Coccidie, coexiste toujours le *Myxobulus*, et, sauf dans l'intestin, les Coccidies se rencontrent à l'intérieur des Myxosporidies

plus ou moins altérées; celles-ci jouent un rôle important dans la diffusion des Coccidies.

Dans l'intestin, les Coccidies sont englobées par les Myxosporidies, elles s'y développent (on peut trouver plusieurs centaines de Coccidies dans un seul *Myxobulus*). Puis les Myxosporidies envahissent les tissus en cheminant à travers les parois de l'intestin ou dans les vaisseaux et transportent leurs hôtes dans les organes, particulièrement dans la rate.

Wierzejski a signalé chez la carpe une semblable association de Myxosporidies et de Coccidies.

Article III. — LES SARCOSPORIDIES.

Les *Sarcosporidies* sont des parasites des muscles striés volontaires ou involontaires des mammifères (souris, rat, singe, otarie, porc, bovidés, équidés, ovidés) et des oiseaux ; on les rencontre parfois aussi dans le tissu conjonctif (1). Chez l'homme leur existence est exceptionnelle; on considère comme des Sarcosporidies les parasites rencontrés dans les reins de l'homme par Hadden, Koch, Klebs et Eve, par Rosenberg dans un muscle papillaire de la valvule mitrale d'une femme, et par Kartulis dans le tissu conjonctif du foie et des muscles d'un Soudanais.

On ne connaît pas le mode de propagation des Sarcosporidies ; il est probable que l'infestation se fait par le tube digestif, puis les parasites gagneraient les muscles voisins. Le point de savoir si l'ingestion de viande infestée est dangereuse n'est pas encore élucidé; Manz a obtenu des résultats négatifs en faisant ingérer à des animaux de la chair contenant des Sarcosporidies.

Morphologie. — D'après Laveran et Mesnil, les Sarcosporidies devraient prendre place dans un genre unique (*Sarcocystis*) et il n'y aurait pas lieu de maintenir les deux familles établies par Blanchard en se basant sur la différence des tissus parasités : ces deux familles renfermant les mêmes espèces à deux états différents d'évolution.

Des fragments de muscle atteint, examinés au microscope, montrent des fuseaux allongés suivant l'axe de la fibre musculaire, logés entre les fibrilles et mesurant 1 à 5 millimètres de long ; ce sont les *Tubes de Miescher*.

La membrane d'enveloppe de ces tubes a été décrite par les anciens auteurs comme épaisse, poreuse et présentant parfois des prolongements en forme de soies. D'après les observations de Laveran et Mesnil, cette membrane est très mince (moins de 1 μ d'épaisseur)

(1) Parfois les Sarcosporidies se développent en quantité prodigieuse dans les muscles ; cette abondance extrême des parasites s'observe surtout chez le porc et le mouton; les muscles de la paroi œsophagienne, de la langue, le psoas, le diaphragme, sont les plus fréquemment envahis.

et est recouverte, à sa surface externe, de filaments ténus disposés transversalement, sauf aux extrémités où ils deviennent obliques et enfin longitudinaux. L'extrême minceur de la membrane peut se constater sur les coupes de Sarcosporidies.

De la paroi interne de la membrane se détachent des cloisons transversales, qui traversent complètement la Sarcosporidie et se relient avec des travées longitudinales ou obliques pour diviser le tube en un certain nombre d'alvéoles contenant les *spores*. Les extrémités du fuseau sont remplies par des amas de jeunes éléments; le parasite continue à s'accroître après avoir formé des spores, cet accroissement a lieu par développement de nouvelles spores à ses deux extrémités.

En se développant, le parasite distend peu à peu la fibre musculaire, détruit le myoplasme et finit par ne plus être entouré que par le sarcolemme et le sarcoplasme : on a ainsi un passage graduel entre les parasites dits intramusculaires (*Sarcocystis*) et ceux qu'on croyait propres au tissu conjonctif (*Balbiana*). Quand le fuseau a atteint le tissu conjonctif, il a toujours une enveloppe secondaire dérivant du muscle, et l'énucléation, qui est très facile, donne le parasite entouré de cette couche d'origine musculaire (Laveran et Mesnil).

Dans le tissu conjonctif, le fuseau s'arrondit, devient ovoïde, la zone de prolifération, jusque-là localisée aux deux extrémités, s'étend à toute la périphérie. La taille du parasite s'accroît, sa longueur peut atteindre un centimètre; il paraît alors formé de trois zones : à la périphérie, la zone de prolifération très mince ; au-dessous, une couche plus épaisse, bourrée de spores et passant graduellement à une partie centrale ne renfermant plus qu'une matière granuleuse, résultat de la désagrégation des spores.



Fig. 252. — Spore de Sarcosporidie, d'après Laveran et Mesnil. — *c*, capsule ; *n*, noyau entouré de granulations.

Les *spores* qui garnissent l'intérieur des tubes de Miescher ont la forme de boudins courbés en demi-cercle et à extrémités arrondies, dont l'une, légèrement amincie, contient une capsule polaire à fil non déroulable. La spore contient en outre un noyau et plusieurs granulations chromatiques. Les spores sont immobiles; elles sont fragiles et s'altèrent rapidement dans la chambre humide et sous l'influence des acides et des alcalis très dilués. Il est probable qu'elles ne représentent pas la forme sous laquelle le parasite se conserve dans les milieux extérieurs (Laveran et Mesnil).

Toxine. — Pfeiffer a signalé que l'extrait aqueux des Sarcosporidies, injecté sous la peau du lapin, tue cet animal après une période de diarrhée et d'hypothermie. Laveran et Mesnil ont repris les recherches de Pfeiffer et ont démontré l'existence, dans les Sarcosporidies du mouton, d'une toxine à laquelle ils ont donné le nom de *Sarcocystine*. Laveran et Mesnil préparent des *extraits aqueux* ou *glycérinés* de Sarcosporidies ; l'activité de l'extrait aqueux diminue rapidement, elle a déjà baissé considérablement le sixième jour ; l'extrait glycériné, aussi actif que l'extrait aqueux, se conserve beaucoup mieux, il garde toute sa toxicité au bout d'un mois.

Préparation. — Énucléer les Sarcosporidies de l'œsophage du mouton, les peser, les broyer dans un mortier avec du sable stérilisé et une quantité connue d'eau ou de glycérine (extrait aqueux ou glycériné); filtrer l'extrait aqueux sur la bougie de porcelaine, l'extrait glycériné sur papier.

Les Sarcosporidies insérées sous la peau donnent lieu aux mêmes accidents que les extraits, à la condition qu'elles aient été ouvertes : lorsque l'enveloppe est intacte, les phénomènes toxiques sont retardés. Laveran et Mesnil préparent un *extrait sec* qui se montre très actif.

Préparation. — Dessécher les Sarcosporidies dans un dessiccateur à acide sulfurique ; les pulvériser et répartir la poudre blanche obtenue dans de petits tubes scellés. Un centigramme de poudre correspond à 5 ou 6 milligrammes de Sarcosporidie fraîche.

Action sur les animaux. — La sarcocystine est très toxique pour le lapin et presque inoffensive pour les autres animaux.

Lapin. — Une quantité d'extrait correspondant à un milligramme de Sarcosporidie fraîche, injectée sous la peau d'un lapin d'un kilogramme, produit vers la deuxième ou troisième heure de la diarrhée et de l'hypothermie ; les accidents cholériformes s'accentuent rapidement, des mouvements convulsifs apparaissent et la mort survient de la cinquième à la dixième heure. Des doses plus faibles du poison donnent un peu d'œdème au point d'inoculation, de la fièvre, de l'amaigrissement, une diarrhée tardive accompagnée d'une légère hypothermie, et la mort n'arrive parfois que le vingtième jour. L'autopsie ne révèle aucune lésion importante.

L'injection d'extrait aqueux dans le péritoine agit comme l'injection sous-cutanée. Avec l'injection intraveineuse, la marche de l'intoxication est un peu plus rapide. L'injection intracérébrale de fortes doses agit comme l'injection sous-cutanée de mêmes doses. Avec des doses de 1 milligramme par kilogramme d'animal, inoculées dans le cerveau, les lapins meurent avec un retard assez

notable sur les lapins témoins inoculés sous la peau. — L'ingestion ou l'introduction d'extrait aqueux dans l'intestin grêle ne produisent aucun trouble morbide.

Animaux divers. — Les *cobayes* résistent à des doses 200 fois plus fortes que celles qui tuent le lapin ; il se produit un léger œdème sous-cutané au lieu de l'injection, la température s'élève légèrement, l'animal maigrit un peu, puis tout rentre dans l'ordre.

Le *rat* et la *souris*, après injection de fortes doses d'extrait aqueux, ont présenté un peu d'œdème ; le *mouton* ne montre rien d'anormal ; un *chien*, ayant reçu à plusieurs reprises de fortes doses de sarcocystine, a diminué de poids ; le *pigeon*, la *poule*, la *grenouille*, la *tortue* ne sont pas sensibles au poison.

Propriétés. — Les propriétés de la sarcocystine se rapprochent de celles de certaines toxines microbiennes ; l'extrait aqueux devient inactif par un chauffage de cinq minutes à 100°, ou de vingt minutes à 85° ; l'extrait glycériné résiste mieux à la chaleur : chauffé à 85° pendant trente minutes, il peut encore, à fortes doses, tuer le lapin.

Le mélange avec la liqueur de Gram ou la solution d'hypochlorite de soude à 1 p. 12 atténue l'activité de l'extrait aqueux.

La trituration de la toxine avec des substances cérébrale ou musculaire du lapin ne diminue en rien son activité : le poison n'est pas fixé par ces substances.

Article IV. — LES COCCIDIES.

Les Coccidies (*Psorospermies oviformes* de Leukart) vivent à l'état parasitaire chez les Vertébrés et les Invertébrés ; elles ont pris depuis quelques années une grande importance en pathologie. Elles se reproduisent suivant deux modes : une *évolution asexuée* et une *fécondation* constituant une véritable *génération alternante* ; nous indiquerons les grandes lignes de cette évolution à propos de la Coccidie du lapin.

COCCIDIUM OVIFORME.

Coccidium cuniculi.

Dans le foie du lapin on rencontre fréquemment des masses blanchâtres ou jaunâtres, ressemblant à de petits abcès ramollis, logés dans les canalicules ou le parenchyme hépatiques et contenant des corps ovales, semblables à des œufs de Nématodes, et qui sont en réalité des Coccidies ; ils possèdent une membrane d'enveloppe réfringente, un protoplasma granuleux, un noyau et un nucléole.

Souvent la guérison survient spontanément, les Coccidies sont expulsées sous forme d'*oocystes* (Voy. plus loin) et à l'autopsie des animaux guéris on ne trouve plus que des foyers cicatrisés, épars à la surface ou dans l'épaisseur du foie. Chez les jeunes lapins, les Coccidies peuvent se multiplier très activement (Pfeiffer), les lésions se propagent dans tout le foie, les canaux biliaires sont dilatés, le tissu conjonctif s'hypertrophie, comprimant les vaisseaux sanguins et entraînant l'atrophie du tissu hépatique. Les organes sont amaigris, décolorés, le sang est pâle et aqueux et l'animal succombe.

La Coccidie du lapin peut se développer chez l'homme; Gubler l'a vue produire dans le foie une vingtaine de kystes purulents, du volume d'une noix ou d'un œuf et dans lesquels les parasites pullulaient. Dans un cas de Silcok, le foie, la rate et l'intestin étaient envahis : dans toutes les lésions se rencontrait le *Coccidium oviforme*.

MORPHOLOGIE. — ÉVOLUTION.

Quand on délaye dans un peu d'eau le contenu d'un kyste et qu'on porte la préparation sous le microscope, on voit nettement le parasite; les Coccidies prennent mal les matières colorantes : une goutte de solution aqueuse d'éosine ajoutée à la préparation teinte le fond en rose, tandis que les parasites restent incolores.

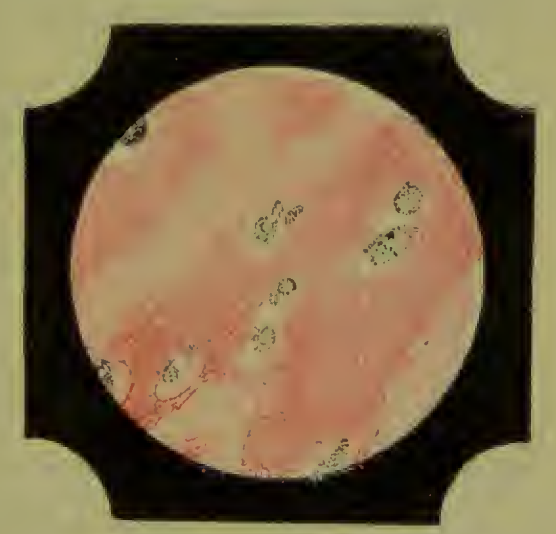


Fig. 253. — Coccidie du lapin. — Pulpe de foie colorée à l'éosine; les parasites restent incolores.

Le *Coccidium oviforme* se rencontre à l'intérieur des cellules épithéliales des conduits biliaires.

Dans ces cellules les kystes ovoïdes mesurent environ 40 μ de longueur sur 20 μ de largeur; ils sont remplis par un protoplasma granuleux qui ne tarde pas à se contracter pour former une sphère écartée de la paroi et possédant un noyau central; la Coccidie est alors à l'état d'*oocyste*, terme ultime de son développement dans l'organisme animal (fig. 254). Les oocystes passent dans l'intestin, sont entraînés au dehors et vont subir dans le milieu extérieur une maturation qui les rend aptes à produire de nouvelles infestations.

Évolution dans le milieu extérieur. — SPOROGONIE. — Si, en effet, on place des oocystes dans une goutte d'eau stérile, disposée dans une cellule de Koch à la température de 15° à 18° (1), on voit dès le deuxième

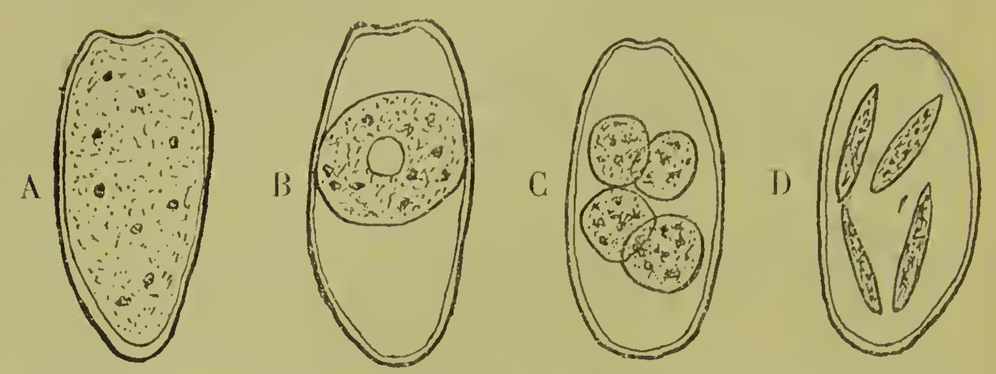


Fig. 254. — *Coccidium oviforme.* — Formes adultes enkystées (d'après Blanchard).

Fig. 255. — *Coccidium oviforme.* — Évolution extra-cellulaire. — C, formation des sporoblastes; D, transformation des sporoblastes en sporocystes (d'après Blanchard).

ou troisième jour leur contenu se fragmenter en deux, puis en quatre petites sphères, les *sporoblastes* (fig. 255). Alors chaque sporoblaste s'allonge pour former un *sporocyste* dont le contenu se divise en trois segments : deux *corpuscules falciformes*, *corps en croissant*, ou *sporozoïtes*, munis chacun d'un noyau, et un *reliquat sporal*, masse granuleuse inutilisée (fig. 256).

Infestation. — Le kyste contenant les sporocystes est très résistant,

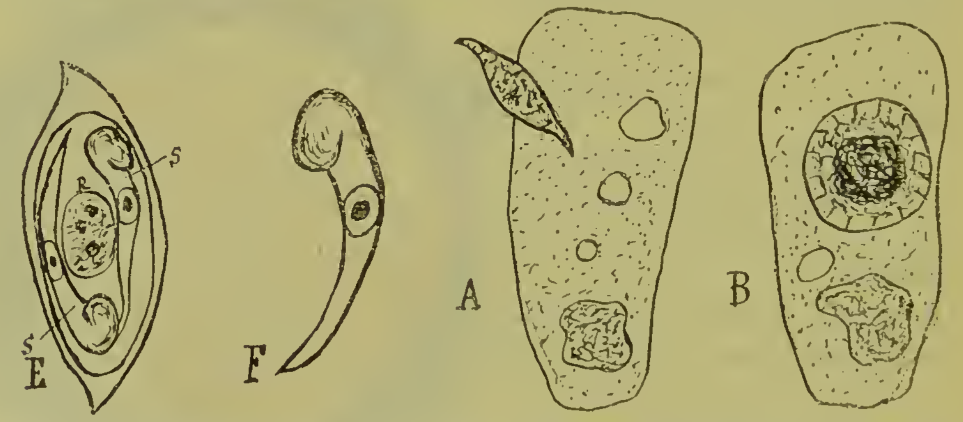


Fig. 256. — *Coccidium oviforme* — E, sporocyste isolé ; *s*, *s*, sporozoïtes, *r*, reliquat sporal ; — F, sporozoïte isolé (d'après Balbiani).

Fig. 257. — *Coccidium oviforme.* — A, sporozoïte pénétrant dans une cellule épithéliale ; B, formation du schizonte.

il conserve longtemps sa vitalité dans le milieu extérieur. Ingéré par le lapin, il se rompt sous l'influence des sucs digestifs et met les sporocystes en liberté ; ceux-ci s'ouvrent à leur tour et livrent passage aux

(1) Léger, Laveran, recommandent le procédé suivant pour étudier l'évolution des Coccidies dans les milieux extérieurs : étendre sur de petits morceaux de charbon les matières contenant les Coccidies, placer ces fragments sur un verre de montre dans lequel on verse quelques gouttes d'eau phéniquée, pour empêcher le développement des moisissures et des bactéries, et déposer le tout dans la chambre humide.

sporozoïtes. Les sporozoïtes sont doués de vifs mouvements, grâce auxquels ils peuvent s'engager dans les voies biliaires. Arrivé au contact d'une cellule épithéliale, le sporozoïte y fait pénétrer d'abord son extrémité antérieure effilée, puis s'y enfonce tout entier; bientôt il parvient au milieu du protoplasma cellulaire, entre le noyau et la surface libre, perd ses mouvements et ne tarde pas à prendre un aspect nouveau : le *schizonte* (fig. 257) qui s'accroît aux dépens de la cellule envahie et se multiplie par division asexuée (*schizogonie*).

Reproduction asexuée ou schizogonie. — Le schizonte s'accroît, prend une forme sphérique, son protoplasma se creuse de larges alvéoles remplies par un liquide clair; bientôt son noyau se divise en un grand nombre de noyaux filles qui se rapprochent de la surface; autour de ces noyaux s'accumule du protoplasma; il en résulte la formation de corpuscules claviformes, d'abord disposés comme les quartiers d'une orange, puis devenant libres et doués de mouvements analogues à ceux des sporozoïtes, ce sont les *mérozoïtes*.

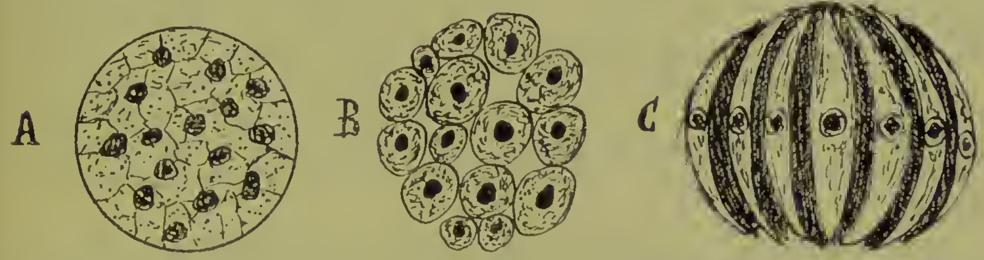


Fig. 258. — *Coccidium oviforme*. — Schizogonie. — A, multiplication nucléaire; B, multiplication cellulaire; C, maturité des mérozoïtes (d'après Simond).

A ce moment la cellule épithéliale se rompt, les mérozoïtes sont mis en liberté : les uns meurent dans l'intestin du lapin, les autres pénètrent des cellules épithéliales nouvelles et sont susceptibles d'y évoluer de différentes façons.

Tantôt le mérozoïte qui vient d'envahir une cellule saine perd ses mouvements, devient sphérique, s'accroît et forme un véritable schizonte qui commence immédiatement à se multiplier par schizogonie : cette *schizogonie répétée* permet au parasite de se multiplier très rapidement dans l'organisme du lapin, c'est à elle qu'il faut attribuer la marche rapidement envahissante de certaines coccidioses.

Tantôt, au contraire, après qu'ils ont pénétré les cellules épithéliales, les mérozoïtes subissent des transformations qui les rendent aptes à la reproduction sexuée.

Reproduction sexuée. — Dans ce cas, les mérozoïtes se transforment, les uns en éléments femelles, *macrogamètes*, les autres en éléments mâles, *microgamètes*.

1° Macrogamètes. — Après pénétration dans la cellule épithéliale, le mérozoïte s'accroît lentement, reste dépourvu de membrane d'enveloppe, et se garnit de granulations constituées par des matériaux de réserve. Son noyau renferme un caryosome. Le macrogamète ainsi constitué est elliptique; bientôt il expulse son caryosome, en même temps qu'il présente quelques contractions qui ont d'ordinaire pour effet de le faire sortir de la cellule-hôte; il reste alors à la surface de l'épithélium où les microgamètes le rencontreront aisément. A ce moment le macrogamète, arrivé à

maturation, est sphérique, immobile et possède un noyau nettement délimité, rapproché de la surface.

2° MICROGAMÈTES. — Le mérozoïte s'accroît rapidement; il reste dépourvu de membrane d'enveloppe et de granulations de substances de réserve; son noyau possède un caryosome volumineux. Ainsi se trouve constitué le *microgamétocyte* dans lequel vont se former les microgamètes. Le noyau se divise pour donner naissance à des noyaux filles placés à la surface de la Coccidie et autour de chacun desquels s'accumule du protoplasma hyalin; bientôt ces noyaux filles s'aplatissent, s'allongent, s'incurvent en virgule : les microgamètes sont constitués, ils continuent à s'allonger et deux *flagellums* apparaissent à leur extrémité antérieure (le point d'insertion des flagellums varie suivant les espèces); les microgamètes présentent des mouvements, deviennent libres et quittent le microgamétocyte qui forme un corps résiduel et se détruit bientôt.



Fig. 259. — Microgamètes libres d'*Echinospora* (d'après Léger).

Le microgamète a une grande ressemblance avec le spermatozoïde des animaux supérieurs : il est très petit (6 à 8 µ de long), agile, d'ordinaire falciforme ; son corps est réfringent, homogène, et presque entièrement formé de chromatine entourée d'une très mince couche de protoplasma (fig. 259).

3° FÉCONDATION. — La fécondation n'a jamais été observée directement chez la Coccidie du lapin, mais il est évident qu'elle s'y effectue d'une façon analogue à ce que l'on observe chez les espèces voisines.

Chez *Coccidium Schubergi* (parasite de l'épithélium intestinal de *Lithobius forcipatus*), on voit le macrogamète, arrivé à maturation, attirer les microgamètes par une influence chimiotaxique : douze à quatorze éléments mâles viennent frétiller autour du macrogamète; par le point de sa surface le plus rapproché du noyau, le protoplasma du macrogamète se soulève en une petite saillie vers laquelle se précipitent les microgamètes (fig. 260), un seul y



Fig. 260. — Fécondation chez *Coccidium Schubergi* (d'après Schaudinn).

pénètre et immédiatement la saillie se rétracte (1); le macrogamète s'enkyste, l'élément mâle arrive au contact de son noyau et finit par se fusionner avec lui, la fécondation est achevée : elle a abouti à la formation de l'*oocyste* qui, rejeté dans le milieu extérieur, se divise par *sporogonie* pour donner naissance aux *sporocystes* qui infesteront de nouveaux hôtes (Voy. plus haut).

COCCIDIUM PERFORANS.

Coccidium hominis.

Espèce très voisine de la précédente, de taille un peu plus petite, se développant dans l'intestin du lapin et de l'homme (Eimer, Rivolta et Grassi, Gubler, Lindermann, etc.). Le parasite habite les cellules épithéliales de l'intestin ; chez l'homme, il a été surtout signalé comme découverte fortuite d'autopsie ou d'examen des selles et ne semble entraîner aucune affection spéciale ; cependant Railliet et Lucet l'ont signalé dans deux cas de diarrhée chronique.

COCCIDIUM BIGEMINUM.

Cytospermium villorum intestinalium canis.

Coccidie vivant dans les villosités intestinales du chat, du chien et probablement aussi de l'homme; c'est elle que Kjellberg semble avoir rencontrée chez un homme, à Berlin. L'évolution se produit comme chez les autres *Coccidium*, mais l'oocyste se divise en deux masses accolées dont chacune donne naissance à quatre sporoblastes.

EIMERIA HOMINIS.

Parasite rencontré par Künstler et Pitres dans le liquide d'une pleurésie purulente chronique latente de l'homme. La Coccidie observée par Künstler et Pitres était à l'état schizogonique; les kystes volumineux, contenus en abondance dans le pus, présentaient dix à vingt mérozoïtes accolés à la membrane et accompagnés d'un noyau de reliquat; on observait aussi dans le pus des mérozoïtes libres mesurant de 20 à 100 μ de longueur. On ne connaît pas la phase sporogonique de cette Coccidie.

KLOSSIA HELICINA.

Ce parasite constitue une excellente espèce pour l'étude des Coccidies, c'est à ce titre que nous en dirons quelques mots. Il se

(1) L'organisme fécondé est parfois désigné sous le nom de *zygote*.

développe dans l'organisme de l'*Helix hortensis* où on le trouve presque à l'état constant.



Fig. 261. — *Klossia helicina*. — Cellule rénale de l'*Helix hortensis* renfermant trois jeunes *Klossia*; le noyau de la cellule est placé vers l'extrémité étirée du pédoncule (d'après Balbiani).

Salomonsen recommande d'opérer ainsi qu'il suit pour l'étude de la *Klossia* :

Écraser la coquille d'un *Helix hortensis* au niveau du deuxième tour de spire, près de l'orifice. Après avoir enlevé les débris de coquille, on aperçoit une partie du poumon et le péricarde au travers duquel on voit battre le cœur; à côté de celui-ci apparaît une masse fusiforme et grisâtre, le rein. On saisit le rein avec une pince, on le détache avec des ciseaux et on en porte une parcelle sur une lame de verre; la préparation est simplement recouverte d'une lamelle.

A l'examen microscopique, on y voit, à côté de cellules normales, des cellules dilatées par des *Klossia* (fig. 261). Le parasite fait son évolution entière dans la même cellule. A l'intérieur de la Coccidie se forment plusieurs sporocystes ; chaque sporocyste donne naissance à quatre sporozoïtes et à un reliquat sporal. Mis en liberté, les sporozoïtes envahissent de nouvelles cellules épithéliales où ils forment des schizontes qui continuent leur évolution selon le mode ordinaire.

ESPÈCES INDÉTERMINÉES CHEZ L'HOMME.

Plusieurs auteurs ont observé chez l'homme des affections coccidiennes dont les parasites n'ont pu être classés.

Kartulis a signalé des tumeurs coccidiennes des muscles; Lindermann a trouvé, sur les valvules sigmoïdes de l'aorte et la valvule mitrale d'un individu mort d'anasarque, des tubercules brunâtres, de 2 à 3 millimètres de diamètre, habités par des Coccidies.

Lindermann a trouvé des Coccidies dans le rein; Milian, Cornil et Duret dans la peau; Gubler, Virchow, Sœmmering, Podwisowsky en ont signalé dans le foie.

THÉORIE PARASITAIRE DES TUMEURS.

Il y a quelques années, la théorie parasitaire des tumeurs malignes trouvait une base scientifique dans la découverte, à l'intérieur de certaines néoformations épithéliales, de productions aux-

quelles on attribuait des ressemblances étroites avec les Coccidies; de tous côtés on signalait dans les tumeurs épithéliales des protozoaires parasites.

Les nombreux travaux suscités par cette découverte ont mis en relief les erreurs d'interprétation que l'on est exposé à commettre dans de telles recherches et ont abouti à faire rejeter par la plupart des anatomo-pathologistes la théorie de l'étiologie coccidienne des tumeurs.

On tend aujourd'hui à considérer les productions dites parasitaires des néoplasmes comme le résultat de dégénérescences cellulaires; ces productions, en effet, ne subissent jamais une évolution comparable à la schizogonie des Coccidies et on ne trouve jamais de caryosome à leur intérieur; enfin, l'évolution anatomique des tumeurs n'est pas de nature à confirmer l'hypothèse d'une étiologie parasitaire; ces néoformations sont constituées par des groupements cellulaires représentant de véritables ébauches de tissus, or ce n'est pas là le fait du parasitisme : « Tout parasite repousse les tissus ou les détruit, mais ne provoque jamais d'évolution tissulaire continue » (A. Brault).

Nous passerons en revue les principales formes décrites comme parasites des tumeurs.

I. — Neisser, en 1888, soutint la nature parasitaire de l'*acné varioliforme;* il y décrivit des corps oviformes qu'il identifia aux Coccidies. Ces corps ne sont que des cellules en transformation vitreuse.

Dans les coupes colorées au picrocarmin de Ranvier, on voit les altérations cellulaires augmenter progressivement de la profondeur à la surface des bourgeons épithéliaux. Les noyaux, bien visibles dans les couches profondes, pâlissent dans les couches situées au-dessus; colorée en rose jaunâtre à la profondeur, la coupe devient de plus en plus jaune quand on se rapproche de la surface; les cellules sont de plus en plus infiltrées par une substance vitreuse hyaline qui finit par occuper tout le corps cellulaire, y compris le noyau; vers la partie moyenne, les cellules ovoïdes hyalines sont serrées les unes contre les autres, entourées d'un réseau filamenteux chargé de granulations d'éléidine, mais elles ne contiennent pas trace d'éléments figurés et l'on ne saurait voir là que les cellules elles-mêmes en transformation cornée et non des corps oviformes parasites.

II. — Darier, Malassez, Wickam, signalent la présence de parasites animaux dans la *psorospermose folliculaire* et la *maladie de Paget du mamelon*; ces parasites seraient des Coccidies enkystées, toujours incluses dans les cellules néoplasiques.

Les formations décrites par ces auteurs ne sont pas, en réalité, des parasites; ce sont des cellules épidermiques, dérivant des cellules malpighiennes par un processus analogue à celui de la kératinisation normale et ayant subi des enroulements, des emboîtements pour

arriver à constituer les globes épidermiques (Borrel, Fabre Domergue, A. Brault, Torök, etc.).

Les réactions microchimiques de ces corps sont celles des cellules kératinisées: le picrocarmin les colore en jaune vif, l'acide osmique en brun foncé, etc.

III. — Dans une tumeur du maxillaire supérieur, Albarran décrit des Coccidies, enkystées ou non, légèrement arrondies, pourvues d'un noyau plus ou moins visible, toujours situées à l'extérieur des cellules épithéliales.

Ces formes ne présentent jamais l'aspect caractéristique des Coccidies, jamais elles ne montrent de corps falciformes. « Les différents aspects que présentent ces cellules, l'accumulation des corps réfringents, la coloration uniforme de toute la masse par la même substance colorante, indiquent, au contraire, que l'on assiste à la désintégration de cellules en voie de disparaître » (A. Brault).

IV. — Un grand nombre d'auteurs ont signalé des Coccidies dans des tumeurs cancéreuses. Les descriptions de ces divers auteurs ne concordent pas entre elles et se rapportent évidemment à des formations très différentes. Nous citerons les travaux de Soudakewitch, Foa, Ruffer, Walker, Thoma, Sawtchenko, etc. Tous ces auteurs rapportent à des Coccidies les formes parasitaires qu'ils décrivent; cependant Sawtchenko a abandonné l'idée du parasitisme animal et tend à considérer les figures qu'il a observées comme relevant de levures.

Technique de Soudakewitch. — Dans cent dix cancers, Soudakewitch a trouvé des figures qu'il attribue à des Coccidies; il emploie la technique suivante :

1° Fixation des pièces. — Par la solution aqueuse saturée de sublimé, ou le liquide de Flemming, ou par immersion pendant quarante-huit heures dans l'acide osmique à 1 p. 100, suivie d'un séjour de trois à cinq jours dans la liqueur de Müller.

2° Inclusion dans la celloïdine.

3° Coloration. — a. *Coupes fixées dans le sublimé.* — Séjour des coupes pendant un à deux jours dans une solution aqueuse de safranine, puis traitement par l'alcool légèrement acidulé avec l'acide azotique, ou par une solution aqueuse faible d'acide picrique.

b. *Coupes fixées dans l'acide osmique.* — Coloration par l'hématoxyline vieille de Ranvier.

Aspect microscopique. — L'examen est pratiqué avec les objectifs 8 ou 9 à sec ; dans les cellules cancéreuses, on voit de petits corps arrondis, sphériques, refoulant et comprimant le noyau ; ces corps possèdent une membrane d'enveloppe, un protoplasma finement granuleux et un noyau. Leurs dimensions peuvent atteindre celles d'un leucocyte ; le plus souvent il n'existe qu'une figure dans la même cellule, quelquefois on peut en constater deux, trois ou même cinq. Après coloration à l'hématoxyline, il

peut apparaître à l'intérieur du parasite des complications de structure fort diverses et dont les figures ci-dessous, reproduites d'après les dessins de Soudakewitch, donnent une idée.

Les cellules contenant ces formations présentent d'ordinaire une hyper-

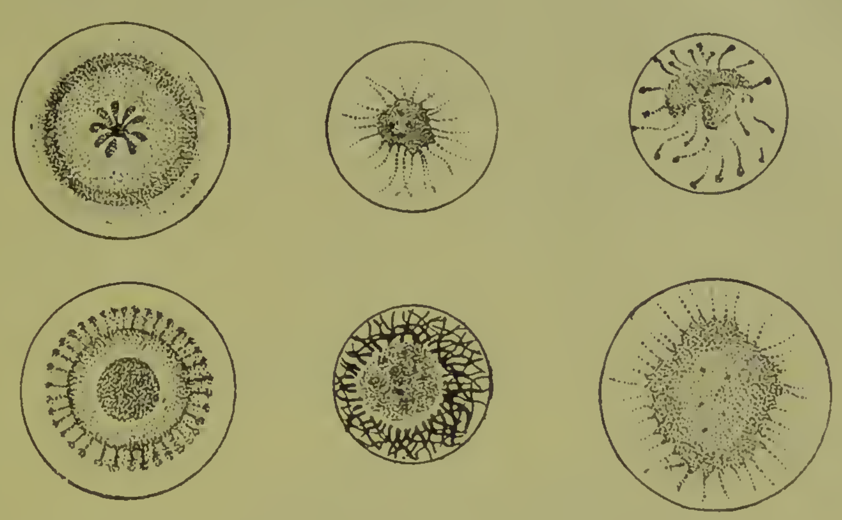


Fig. 262. — Parasites du cancer (d'après Soudakewitch).

trophie considérable et sont en voie de reproduction karyokinétique ; parfois encore on note la nécrose du noyau et la destruction du protoplasma cellulaire. D'après Soudakewitch, le parasite pénétrerait dans le corps de la cellule, y végéterait en refoulant le noyau puis le protoplasma à la périphérie; à la destruction de la cellule envahie est liée la libération du parasite, la capsule de celui-ci se rompt elle-même et les spores mises en liberté infestent les cellules voisines. Le mode de propagation le plus important serait celui qui emprunte la voie intracellulaire : la cellule cancéreuse se divise par karyokinèse et donne deux cellules filles toutes deux infestées.

Technique de Ruffer. — Examen a l'état frais. — Enlever avec un scalpel un peu de suc cancéreux, le porter sur une lame, recouvrir d'une lamelle et examiner avec l'objectif 8 ou 9. En éclairant avec le condensateur Abbé on voit, à l'intérieur de certaines cellules épithéliales, des espaces ronds ressemblant, à première vue, à des vacuoles, mais entourés d'une membrane à double contour et contenant un corps difficile à voir avec l'éclairage du condensateur; en supprimant l'éclairage du condensateur on constate que ce corps est constitué par un noyau entouré d'une couche de protoplasma homogène.

On peut obtenir une préparation colorée en mélangeant une goutte de suc cancéreux avec une goutte de matière colorante, recouvrant d'une lamelle et lutant à la paraffine. La matière colorante de choix est une solution aqueuse de bleu de méthylène, additionnée d'un peu d'une solution aqueuse de vert de méthyle et très légèrement acidifiée par l'acide acétique ; ce mélange colore le noyau de la cellule épithéliale en vert et son protoplasma en bleu très pâle ; au contraire, le noyau du parasite est coloré en rose et son protoplasma en bleu pâle.

Coupes. — *Fixation.* — Placer pendant douze à vingt-quatre heures, dans la solution aqueuse saturée de sublimé, des fragments de la tumeur

mesurant 4 à 5 millimètres carrés. Laver à l'eau courante, durcir dans les alcools progressivement renforcés. Monter dans la paraffine au xylol.

Coloration. — La coupe, fixée sur lame et débarrassée de la paraffine, est traitée successivement par l'alcool, l'eau, le liquide de Gram, l'alcool et l'eau. La coloration peut être pratiquée à l'aide du procédé de Biondi-Ehrlich (1), qui teinte les noyaux des cellules épithéliales en vert, leur nucléole en rouge intense, leur protoplasma en rouge, tandis que le noyau du parasite se colore en rouge et que son protoplasma reste presque incolore.

Il est préférable de faire subir aux coupes la préparation suivante :

a. Séjour pendant une à deux minutes dans une solution aqueuse d'hématoxyline à 5 p. 100. Laver à l'eau.

b. Placer la coupe dans une solution concentrée de sulfate de cuivre jusqu'à coloration noire.

c. Porter la coupe dans l'acide chlorhydrique à 1 p. 1 000 jusqu'à coloration jaune pâle.

d. Traiter la coupe pendant quelques secondes par la solution de sulfate de cuivre jusqu'à teinte bleue; laver à grande eau.

e. Faire alors agir une couleur acide, par exemple une teinture concentrée de cochenille.

Dans les préparations ainsi colorées, le noyau des cellules est bleu, leur protoplasma bleu rougeâtre, et le parasite rouge.

Aujourd'hui, bien peu de pathologistes reconnaissent des Coccidies dans les formations que nous venons d'étudier. Borrel, Fabre-Domergue, Duplay et Cazin, A. Brault se sont élevés contre la théorie de l'étiologie coccidienne du cancer; sans entrer dans le détail des objections qu'ils ont opposées aux partisans du parasitisme, disons que la série des parasites supposés, décrits dans les tumeurs, ne présente aucune homogénéité et ne rappelle en rien les formes caractéristiques de l'évolution des Coccidies; au contraire, il existe une similitude morphologique complète entre les pseudo-parasites et les divers aspects que présentent les cellules en voie de dégénérescence. D'après A. Brault, les figures décrites comme Coccidies dans les tumeurs sont des modifications cellulaires caractérisées dans l'énoncé des formes suivantes : 1° encapsulement de certaines cellules; 2° dégénérescence hyaline; 3° production de cellules endogènes; 4° bourgeonnement excessif des noyaux; 5° dégénérescences multiples des noyaux et des nucléoles.

(1) Le colorant de Biondi-Ehrlich s'obtient de la façon suivante : préparer des solutions aqueuses saturées de vert de méthyle, fuchsine acide et orange d'aniline, les laisser reposer trois à quatre jours, puis mélanger 100 centimètres cubes de la solution d'orange, 50 centimètres cubes de vert de méthyle et 20 centimètres cubes de fuchsine acide ; filtrer, diluer une partie du mélange dans 60 à 100 parties d'eau ; laisser la préparation pendant vingt-quatre heures dans le bain ainsi préparé, laver à l'alcool fort, à l'alcool absolu, au xylol et monter dans le baume.

ARTICLE V. — LES COCCIDIOIDES.

Ce sont des parasites encore mal connus, rencontrés chez l'homme, et qui semblent devoir être rangés parmi les Sporozoaires (Blanchard). Ils ont été rencontrés quatre fois, d'abord par Wernicke à Buenos-Aires, puis par Rixford et Gilchrist aux États-Unis, enfin par Posadas dans la République Argentine. Blanchard admet que les formes parasitaires observées, attribuées à trois espèces différentes, n'en constituent qu'une seule, le *Coccidioides immitis*.

La maladie débute par la peau, puis les parasites envahissent plus ou moins vite les voies lymphatiques, la maladie se généralise et entraine la mort après un temps plus ou moins long. L'affection est inoculable par la voie sous-cutanée aux mammifères et aux oiseaux ; le singe est très réceptif (Posadas).

Aux endroits envahis, la peau se couvre de papules, qui confluent bientôt pour former des plaques dont le centre s'ulcère et produit un écoulement purulent contenant de nombreux kystes; dans les ganglions, les viscères, les lésions sont analogues à celles de la tuberculose miliaire; dans les nodules on trouve un ou deux parasites libres ou situés dans une cellule géante.

Dans les lésions cutanées, les parasites sont logés entre les cellules ; ils sont constitués par des masses protoplasmiques arrondies mesurant de 20 à 80 μ de diamètre, entourées d'une membrane d'enveloppe épaisse. Leur développement n'est pas connu dans ses détails, il se fait très activement par des bipartitions qui s'opèrent à l'intérieur de la membrane d'enveloppe, puis celle-ci se déchire et les éléments jeunes se développent sur place ou sont entraînés par les vaisseaux lymphatiques et sanguins.

ARTICLE VI. — LES HÉMATOZOAIRES.

LES HÉMATOZOAIRES DU PALUDISME.

Plasmodium malariæ. — Plasmodium vivax. — Laverania malariæ.

L'agent pathogène du paludisme a été découvert par Laveran; c'est un parasite polymorphe appartenant à la classe des Sporozoaires.

RECHERCHE.

L'Hématozoaire doit être recherché dans le sang des impaludés, de préférence un peu avant les accès ou au début de ceux-ci. Chez certains cachectiques, les parasites se rencontrent dans le sang, même dans l'intervalle des accès, mais, en règle, ils disparaissent

du sang périphérique pendant les périodes d'apyrexie, surtout quand les malades sont soumis à la médication quinique. Les corps en croissant résistent mieux que les autres formes à cette médication. La recherche portera de préférence sur le sang frais.

Examen du sang frais. — On lave le doigt du malade au savon, puis à l'alcool, pour débarrasser la peau de toute matière grasse, et on en pique la pulpe avec une épingle flambée. La première goutte de sang est essuyée avec un linge fin et les suivantes sont recueillies sur des lames de verre scrupuleusement propres (Voy. p. 128). Chaque goutte de sang est immédiatement recouverte d'une lamelle. Quand la goutte de sang est un peu grosse, on presse légèrement sur la lamelle et on essuie le sang qui suinte sur les bords de celle-ci, de manière à obtenir une couche de sang très mince dans laquelle les hématies soient étalées à plat et non disposées en piles. Dans la plupart des cas, il est inutile de border à la paraffine, le sang, en se coagulant sur les bords de la préparation, formant une occlusion suffisante. La préparation doit être examinée avec l'objectif 8 ou 9. Pour étudier les mouvements des éléments parasitaires il est bon de border à la paraffine, afin de supprimer les mouvements que l'évaporation du sang imprime aux hématies.

On peut colorer le parasite vivant; pour cela on dépose sur la lame, à côté de la goutte de sang, une goutte de solution de bleu de méthylène dans une solution aqueuse de chlorure de sodium à $0^{gr},75$ p. 100; on recouvre d'une lamelle, les deux gouttes se mélangent et bientôt les parasites ont absorbé la matière colorante qui n'est pas toxique pour eux; on les distingue alors plus facilement sur le fond incolore (Neveu-Lemaire).

Examen du sang desséché. — On peut encore utiliser, pour la recherche et l'étude de l'Hématozoaire, des lamelles de sang desséchées.

Pour cela on prépare des lamelles de sang selon la méthode ordinaire (Voy. p. 212); les lamelles sont séchées à l'air, puis fixées dans la flamme ou mieux par l'alcool-éther. Pour l'examen sans coloration, ces lamelles sont montées à sec par simple application sur une lame porte-objet à laquelle on les fixe en bordant à la paraffine.

Coloration. — Les Hématozoaires peuvent être colorés par divers réactifs, en particulier par le bleu de méthylène, le violet de gentiane, le violet-dahlia et l'hématoxyline de Bœhmer. En général l'examen des préparations colorées est moins instructif que celui des préparations fraîches.

Les lamelles de sang sont préparées comme nous l'avons dit plus haut; après l'action de la chaleur, il est bon de compléter la fixation en versant sur la préparation quelques gouttes d'alcool-éther.

1° *Bleu de méthylène.* — *a.* Faire agir sur la lamelle pendant trente secondes une solution aqueuse saturée de bleu de méthylène, laver, sécher et monter dans le baume. Les globules rouges ne sont pas colorés, les noyaux des leucocytes et les parasites fixent le bleu, ces derniers restent plus pâles.

b. Faire agir d'abord une solution d'éosine à 0,5 p. 100, puis colorer avec la solution aqueuse de bleu et terminer comme plus haut; on obtient ainsi une double coloration : les hématies sont colorées en rose, les noyaux des leucocytes et les parasites en bleu. Ce procédé est celui que recommande Laveran.

c. Colorer les lamelles par le mélange éosine-bleu de méthylène de Chenzinsky (Voy. p. 218).

2° *Violets.* — Le violet de gentiane ou le violet-dahlia en solution aqueuse saturée, l'hématoxyline de Bœhmer, sont laissés en contact seulement quelques secondes avec les lamelles; puis on lave, on sèche et on monte dans le baume de Canada. Les hématies ne sont pas colorées; les noyaux des globules blancs et les parasites sont teintés en violet; les grains de pigment sont peu visibles.

Coloration des noyaux. — La coloration des noyaux des hématozoaires est malaisée et exige des procédés spéciaux.

Procédé de Romanowsky. — Le sang desséché sur des lamelles est placé à l'étuve sèche entre 105° et 110° pendant une heure environ; les lamelles sont ensuite plongées, pendant au moins deux heures, dans le bain suivant préparé récemment :

Solution aqueuse saturée de bleu de méthylène (1)	.....	2 volumes.
— d'éosine à 1 p. 100	....	5 —

Au sortir du bain colorant les lamelles sont lavées à l'eau, séchées et montées dans le baume. Les noyaux des hématozoaires se colorent en rouge violet, et leur protoplasma se colore en bleu. Ce procédé échoue parfois.

Procédé de Laveran. — Procédé de choix. — Il est basé sur l'emploi du *bleu de Borrel.*

Préparation du bleu de Borrel. — Placer dans un flacon de 150 centimètres cubes environ de capacité quelques cristaux d'azotate d'argent et 50 centimètres cubes d'eau distillée; après dissolution remplir le flacon avec une solution de soude, agiter. Le précipité noir d'oxyde d'argent est soigneusement lavé à plusieurs reprises à l'eau distillée; la dernière eau de lavage décantée, on la remplace par une solution aqueuse saturée de bleu de méthylène, on agite à plusieurs reprises, laisse sept à huit jours en contact, puis on décante le liquide qui constitue le *bleu de Borrel.*

Les lamelles de sang desséché sont fixées par un séjour d'une

(1) Employer le bleu médicinal de Höchst et l'éosine soluble à l'eau.

heure dans l'alcool absolu, puis elles sont placées dans la solution colorante suivante préparée au moment du besoin :

Bleu de Borrel (1)	1 centimètre cube.
Solution aqueuse d'éosine à 1 p. 100...	5 centimètres cubes.
Eau distillée	4 —

Mélanger avec soin ; les solutions d'éosine et de bleu sont filtrées au moment où l'on fait le mélange ; celui-ci ne doit pas être filtré.

Le mélange est placé dans des verres de montre, les lamelles sont disposées à la surface du liquide, la face enduite en bas, de manière à ce qu'elles surnagent pendant que la coloration s'opère. Après un contact plus ou moins long avec le bain colorant (cinq à dix minutes pour l'Hématozoaire du paludisme dans les lamelles récemment préparées; plus longtemps pour les lamelles anciennes; plusieurs heures pour les Hématozoaires des oiseaux), les lamelles sont lavées à grande eau, puis soumises pendant environ une minute à l'action d'une solution aqueuse à 5 p. 100 de tannin. Enfin les lamelles sont lavées de nouveau à l'eau distillée, séchées et montées dans le baume.

Avant de monter dans le baume, il est bon d'examiner la préparation à sec; si la coloration est trop intense ou s'il existe un dépôt abondant, on lave à l'alcool absolu.

Les hématies sont colorées en rose et les noyaux des leucocytes en violet foncé. Les noyaux des Hématozoaires se colorent en violet ou en rouge violacé, leur protoplasma se teinte en bleu pâle.

MORPHOLOGIE.

ASPECT DANS LE SANG HUMAIN.

L'Hématozoaire de Laveran se rencontre dans le sang des paludéens sous une des quatre formes suivantes :

1° *Corps sphériques.* — Les corps sphériques constituent la forme la plus communément observée; ce sont de petits éléments dont la taille varie de 1 à 6 µ et qui sont formés par une substance hyaline, incolore, transparente. Ils sont animés de mouvements amiboïdes, d'où le nom de *corps amiboïdes* qui leur est parfois donné. Les corps sphériques apparaissent d'ordinaire comme de petites taches claires accolées aux globules rouges, une même hématie pouvant porter deux, trois et même quatre de ces corps; parfois ils sont libres dans le sérum.

Les plus petits des corps amiboïdes présentent parfois un ou deux grains de pigment noir; à mesure que le volume du parasite aug-

(1) La solution de bleu de Borrel doit être renouvelée quand elle donne rapidement un abondant précipité après son mélange avec la solution d'éosine.

mente, les grains de pigment deviennent plus nombreux; ces grains sont disposés, tantôt en couronne à la périphérie de l'élément amiboïde, tantôt en agglomérations irrégulières à l'intérieur de celui-ci; souvent ils sont animés d'un mouvement vif plus irrégulier et plus inconstant que le mouvement brownien.

Les corps amiboïdes présentent en outre un noyau, placé excentriquement, accolé à la paroi et très difficile à colorer. Dans les préparations traitées par le bleu de méthylène, le protoplasma se colore en bleu et le noyau est représenté par une vacuole claire; par les procédés de Romanowsky et de Laveran on colore en violet, à l'intérieur du noyau, une tache chromatique.



Fig. 263. — Hématozoaire du paludisme. — Corps sphériques. (Grossissement : 330 diamètres.)

Dans les préparations de sang frais, au bout d'une demi-heure à trois quarts d'heure, les mouvements amiboïdes s'arrêtent et les corps sphériques prennent leur forme cadavérique; les contours en deviennent irréguliers, les grains de pigment s'accumulent irrégulièrement en certains points.

2° *Corps en rosace ou en marguerite.* — Les corps en rosace, corps en marguerite, ou corps segmentés, représentent un mode de reproduction (schizogonie) de l'Hématozoaire de Laveran. On ne les rencontre qu'en très petit nombre dans les états chroniques; on les recherchera de préférence à la première période des accès de fièvre. Parfois on ne les rencontre pas dans le sang, mais uniquement dans le foie et la rate.

Certains corps sphériques présentent des bords légèrement dentelés en même temps que leurs grains de pigment se réunissent au centre en un seul amas, c'est le premier degré de la segmentation. Bientôt les dentelures deviennent plus profondes, l'aspect en marguerite apparaît, puis chacun des segments se sépare de telle sorte qu'il se produit une série de petits corps sphériques libres et ne contenant pas de pigment (*mérozoïtes*). Le pigment n'apparaît que dans les formes adultes.

Les marguerites peuvent présenter un nombre variable de segments, tantôt on en compte huit, tantôt six à vingt. D'après Golgi,

les formes à huit segments se rencontreraient dans la fièvre quarte, celles à seize ou vingt segments dans la fièvre tierce.

3° *Corps en croissant.* — Les corps en croissant s'observent surtout dans le sang des individus atteints depuis longtemps et présentant de la cachexie palustre.

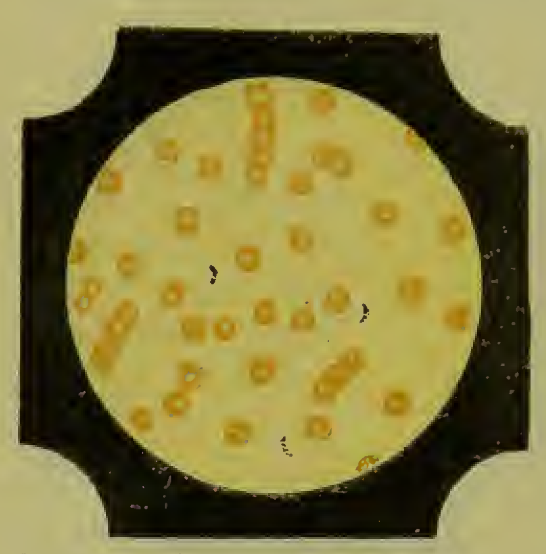


Fig. 264. — Hématozoaire du paludisme. — Corps en croissant. (Grossissement : 330 diamètres).

Leur substance est transparente, incolore, excepté à la partie moyenne où se trouve un amas de grains de pigment noir. Leur longueur est de 8 à 9 μ, leur largeur de 2 μ environ. Du côté de la concavité on aperçoit souvent une ligne très fine qui réunit les deux extrémités du croissant. Les corps en croissant nagent dans le sérum ou sont accolés aux hématies.

Laveran a constaté que, par la suite, les corps en croissant se transforment en un corps d'abord ovalaire, puis sphérique. Comme nous le dirons plus loin, ils représentent un stade de l'évolution sexuée de l'Hématozoaire (*sporogonie*).



Fig. 265. — Hématozoaire du paludisme. — Flagella. (Grossissement : 330 diamètres).

4° *Flagella.* — Sur les bords des corps sphériques de moyen volume, on voit parfois des filaments mobiles ou flagella qui s'agitent très rapidement en imprimant aux globules rouges voisins des mouvements variés. Les flagella ont trois à quatre fois le diamètre des hématies, mais leur transparence et leur finesse sont telles que lorsqu'ils sont au repos il est à peu près impossible de les voir. Sur chaque corps amiboïde il peut exister un à quatre flagella disposés d'une façon symétrique ou groupés sur un même point. Les mouvements de chaque flagellum sont indépendants ; le déplacement des flagella imprime souvent des mouvements peu étendus au corps sphérique ; tantôt il s'agit

d'un simple mouvement oscillatoire sur place, tantôt on observe une véritable translation.

Certains flagella présentent à leur extrémité libre un petit renflement piriforme.

A un moment donné, les flagella se séparent des corps amiboïdes,



Fig. 266. — Hématozoaires du paludisme (d'après Laveran). — *a*, Hématie normale ; *b*, hématie avec un corps sphérique de très petit volume, non pigmenté ; *c*, *d*, *e*, hématies avec des corps sphériques pigmentés, petits et moyens ; *f*, hématie avec quatre petits corps sphériques ; *gh*, corps sphériques libres ayant atteint leur développement complet ; *i*, corps segmenté adhérent à une hématie ; *j*, corps segmenté libre ; *k*, les segments s'arrondissent et deviennent libres ; *l*, *m*, petits corps sphériques libres ; *n*, corps sphérique avec trois flagella ; o, corps sphérique avec un flagellum ; *p*, flagellum libre ; *q*, *r*, corps en croissant ; *s*, corps ovalaire ; *t*, corps sphérique dérivé d'un corps en croissant ; *u*, corps sphérique après le départ des flagella ; *v*, *x*, leucocytes mélanifères.

deviennent libres et se déplacent rapidement au milieu des hématies dans le champ du microscope ; dès que les flagella se sont détachés, les corps pigmentés se déforment et leurs grains de pigment s'accumulent en amas.

Morphologiquement les corps flagellés représentent des *microgamétocytes* (Voy. plus loin); ils ne se forment jamais dans le sang circulant; ils apparaissent très vite dans le sang retiré des vaisseaux, mais il y disparaissent rapidement. Leur évolution complète ne peut avoir lieu que dans le tube digestif de certains moustiques.

PLURALITÉ DES ESPÈCES D'HÉMATOZOAIRES DU PALUDISME.

Depuis longtemps, les auteurs italiens (Golgi, P. Canalis, Grassi et Feletti, etc.) ont distingué plusieurs espèces dans l'Hématozoaire de Laveran. Les uns décrivaient un parasite de la fièvre quarte, un parasite de la fièvre tierce et des formes irrégulières, les autres reconnaissaient jusqu'à cinq espèces correspondant à des manifestations cliniques différentes.

Aujourd'hui la plupart des savants admettent avec Golgi l'existence de trois espèces d'Hématozoaires :

1° *Plasmodium malariæ*, parasite de la fièvre quarte, à schizontes plus petits qu'un globule rouge, se divisant en forme de marguerite, ne formant pas de gamètes en croissant.

2° *Plasmodium vivax*, parasite de la fièvre tierce, à schizontes plus grands qu'un globule rouge, se divisant en forme de mûre, ne formant pas de gamètes en croissant.

3° *Laverania malariæ*, parasite des fièvres pernicieuse, irrégulière, quotidienne, formant des gamètes en croissant.

Laveran n'admet pas la pluralité des espèces d'Hématozoaires ; pour lui, les observations cliniques et les recherches microscopiques démontrent l'unité clinique et étiologique du paludisme. Il reconnaît l'existence de deux variétés (*Hæmamœba malariæ*, var. *parva* ; *Hæmamœba malariæ*, var. *magna*) qui ne constituent pas des espèces différentes, car il a observé le passage de l'une à l'autre.

ÉVOLUTION.

Comme les Coccidies, l'Hématozoaire du paludisme présente deux modes de reproduction :

1° La *reproduction asexuée* ou *schizogonie*, dans le sang de l'homme.

2° La *reproduction sexuée* ou *sporogonie*, hors du corps de l'homme, dans le tube digestif de certains moustiques (genre *Anopheles*) (Laveran, Manson, Ross, Grassi, Bignani et Bastianelli, etc.).

Reproduction asexuée. — Le *corps sphérique* ou *schizonte*, arrivé à l'état adulte, entre en schizogonie : son noyau se divise en un certain nombre de noyaux filles qui se portent à la périphérie, le protoplasma se divise à son tour au moyen d'incisures partant de la périphérie : le schizonte prend l'aspect en marguerite, le pigment s'accumule à la partie centrale; les segments délimités par les incisures du corps en marguerite constituent les *mérozoïtes* ; ceux-ci deviennent libres, se répandent dans le plasma sanguin, s'accolent aux globules rouges, les pénètrent, se chargent de pigment et ne tardent pas à constituer des schizontes adultes.

La schizogonie se répète un grand nombre de fois; grâce à ce processus de reproduction endogène, le parasite envahit l'organisme avec une extrême rapidité; l'accès fébrile coïncide avec la mise en liberté des mérozoïtes; dans la *fièvre tierce*, par exemple, il se produit tous les deux jours une génération nouvelle.

Reproduction sexuée. — A côté des corps sphériques et des corps en marguerite (schizontes), on trouve dans le sang des paludéens des *gamètes* représentés par des *corps en croissant* ou des corps sphériques libres plus grands que les schizontes ; ces gamètes dérivent « de mérozoïtes épuisés par une longue série de multiplications schizogoniques et ayant évolué, pour cette raison, dans une autre direction » (Blanchard).

Dans le sang, les corps en croissant ne sont pas capables de se reproduire; en dehors de tout traitement par la quinine, ils s'accumulent dans l'organisme et deviennent très nombreux dans la cachexie palustre. Les corps en croissant manquent dans certains cas de fièvre palustre, en particulier chez les malades traités de bonne heure par la quinine ; on trouve alors dans le sang des corps sphériques libres qui ont la même signification que les corps en croissant ; « les corps en croissant n'ont donc qu'une signification secondaire au point de vue morphologique et systématique ; on ne peut leur attribuer aucune importance spécifique ou générique ainsi que plusieurs auteurs ont voulu le faire » (Blanchard).

Quand un *Anopheles* femelle (les mâles ne piquent pas) pique un paludéen, il absorbe une certaine quantité de sang renfermant les formes parasitaires que nous avons énumérées ; dans le tube digestif du moustique, les corps amiboïdes jeunes et les schizontes sont rapidement détruits, seuls les gamètes continuent à vivre et évoluent. Les gamètes sont de deux sortes. Les uns s'arrondissent, deviennent sphériques et présentent une petite masse centrale, irrégulière, de chromatine: ce sont les éléments femelles ou *macrogamètes*. Les autres deviennent également sphériques, mais bientôt ils émettent un certain nombre de *flagella* (ordinairement quatre), semblables à ceux que nous avons vus se former dans les préparations de sang frais : ils constituent les *microgamétocytes* ; bientôt les flagella ou *microgamètes* se détachent et vont à la rencontre des macrogamètes. Après la séparation des flagella, le microgamétocyte ne tarde pas à mourir.

Le microgamète aborde le macrogamète, le pénètre et le féconde (Voy. *Coccidies*) : le corps fécondé ou *zygote* est formé.

Le zygote jeune, d'abord sphérique, s'allonge, pénètre entre les cellules épithéliales de la muqueuse stomacale, s'enkyste dans la musculeuse, et d'ordinaire continue son évolution : il ne présente alors que quelques grains de pigment.

A côté des zygotes légèrement pigmentés, on rencontre parfois des kystes bourrés de gros grains d'un pigment noirâtre, décrits par Ross sous le nom de *black spores*, et qui ne semblent avoir aucun rapport avec l'Hématozoaire.

Le zygote, continuant à évoluer, soulève la paroi externe de l'es-

tomac ; sa substance chromatique est réunie en une masse centrale. A ce moment commencent les phénomènes qui aboutissent à la formation de l'*oocyste;* la substance chromatique se divise en un grand nombre de petits fragments qui se portent à la périphérie et s'entourent de protoplasma; d'abord sphériques, les *sporozoïtes* ainsi constitués s'allongent, s'effilent aux extrémités; bientôt l'oocyste se rompt et les sporozoïtes sont mis en liberté dans la cavité générale de l'insecte; ils sont entraînés par le courant circulatoire dans le thorax et la tête, et vont particulièrement envahir les glandes salivaires. Quand l'*Anopheles* ainsi infesté pique un individu sain, il lui inocule dans le sang des sporozoïtes en même temps que son venin. Les sporozoïtes se comportent comme les mérozoïtes, ils envahissent les globules rouges et donnent naissance à des corps sphériques amiboïdes.

Technique de l'examen des moustiques.

Neveu-Lemaire indique la technique suivante :

L'insecte étant dans un tube de verre, on verse sur le tampon d'ouate qui bouche celui-ci quelques gouttes de chloroforme; dès que l'animal est anesthésié, on lui arrache les pattes et les ailes et on le place sur une lame.

Pour retirer l'estomac, on fixe le moustique en appuyant avec une aiguille à l'endroit où finit le thorax et où commence l'abdomen, puis avec une seconde aiguille on tire délicatement sur les deux derniers anneaux de l'abdomen; les aiguilles doivent être tenues horizontalement. L'estomac se brise au niveau de son union avec l'œsophage et sort en entraînant l'intestin; on l'examine dans une des deux solutions suivantes :

1. Formol du commerce	2 grammes.
Eau distillée	100 —
2. Chlorure de sodium	1gr,50
Blanc d'œuf	n° 1
Eau distillée	250 grammes.

Filtrer le mélange au moment de l'usage.

L'examen est d'abord pratiqué avec un faible grossissement ; quand on a découvert des kystes, on utilise un objectif fort (8, 9 ou 1/12 immersion). Si l'estomac contient encore du sang, on le dilacère dans la solution de sel marin à 0gr,75 p. 100, le sang se répand dans le liquide, on recouvre d'une lamelle et on cherche les parasites.

La recherche dans les glandes salivaires est plus délicate, la dissection doit se faire sous la loupe. Une aiguille tenue horizontalement fixe la partie médiane du thorax, une seconde aiguille détache doucement la tête de façon à entraîner avec elle les trois lobes des glandes salivaires.

L'examen a lieu dans le liquide suivant :

Eau distillée	100 grammes.
Formol du commerce	2 —
Chlorure de sodium	0gr,75

Coloration. — Disséquer l'estomac dans la solution de sel marin

à 0gr,75 p. 100, l'exposer une minute aux vapeurs d'acide osmique, colorer au picrocarmin, monter dans la glycérine.

On peut colorer les parasites dans le sang non digéré de l'estomac; après dissection de celui-ci dans la solution de chlorure de sodium, on recueille une goutte de liquide et on en prépare une lamelle qui sera colorée comme nous l'avons dit page 621 (Procédé de Romanowsky).

On colorerait de même les sporozoïtes : l'estomac étant isolé dans la solution de chlorure de sodium, on brise l'oocyste par une légère pression; les sporozoïtes sont mis en liberté dans le liquide dont une goutte est examinée comme nous venons de le dire.

Coupes. — Pour la confection des coupes, le meilleur procédé consiste à fixer l'*Anopheles* en entier. Après avoir arraché les pattes et les ailes, on verse sur lui du sublimé acide bouillant (Voy. p. 210); le corps se brise en deux ou trois morceaux que l'on inclut dans la paraffine (Voy. p. 221). Les coupes, très fines, sont colorées par l'hématoxyline de Bœhmer ou de Heidenhain.

INOCULATIONS.

L'Hématozoaire est inoculable à l'homme (Gerhardt, Mariotti et Ciarocchi, Marchiafava et Celli, etc.); il semble que, pour réussir, l'inoculation de sang palustre doit être pratiquée dans une veine et non sous la peau. Huit à dix jours après l'inoculation, les parasites apparaissent dans le sang, en même temps que se manifestent les symptômes du paludisme.

Le singe est réfractaire; les diverses tentatives d'inoculation aux animaux ont toujours échoué (Laveran, Richard, Celli et San Felice, etc.).

Tous les essais de culture de l'Hématozoaire ont échoué.

LES HÉMATOZOAIRES DES OISEAUX.

Le sang d'un grand nombre d'oiseaux (geai, pie, corneille, corbeau, faucon, chouette, hibou, pigeon, pinson, alouette, calfat, etc.), contient des hématozoaires voisins de l'Hématozoaire du paludisme. Ces parasites ont été étudiés par Danilewsky, Laveran, Grassi et Feletti, etc. Laveran a montré qu'ils sont différents de l'Hématozoaire du paludisme.

Les hématozoaires observés chez les divers oiseaux se ressemblent fort; Grassi et Feletti admettent l'existence d'un certain nombre d'espèces :

Hæmamœba relicta,
Hæmamœba subpræcox,
Hæmamœba subimmaculata,
Laverania Danilewsky.

Il y a peut-être lieu de réunir ces parasites en une espèce unique : *Laverania Danilewsky*.

Les hématozoaires des oiseaux sont le plus souvent accolés à la surface ou inclus dans l'intérieur des hématies. Les corps sphériques sont les plus

fréquemment observés, parfois ils deviennent ovoïdes ; ils déforment et détruisent progressivement l'hématie et sont mis en liberté. Quand ces corps sont parvenus à l'état adulte, ils peuvent prendre deux formes distinctes (Mac Callum, Opie, Marchoux) :

1° Éléments légèrement granuleux, se colorant bien par le bleu de méthylène et contenant des grains de pigment disséminés. La méthode de coloration de Laveran (Voy. p. 621) montre que leur noyau est régulièrement arrondi ou ovalaire, situé vers la partie moyenne du parasite, et contient un petit karyosome ; le noyau, dans ce cas, est coloré en violet, le karyosome est plus foncé. Ce sont les *éléments femelles*.

2° Éléments hyalins contenant de gros grains de pigment reportés aux extrémités, se colorant difficilement par le bleu, possédant un gros noyau très allongé, à contours irréguliers, et occupant toute la partie moyenne du parasite (procédé de coloration de Laveran). Après leur sortie de l'hématie, ces formes parasitaires prennent un aspect sphérique et donnent naissance à des *flagella* ; elles constituent les *éléments mâles*.

Les *corps segmentés* ou en marguerite sont rarement observés (Danilewsky). Laveran n'en a jamais rencontré chez l'hématozoaire du calfat (*Padda oryzivora*).

Il n'est pas démontré que ces parasites aient une action pathogène et fébrigène ; d'ordinaire ils ne donnent lieu à aucun trouble apparent chez les animaux qui en sont porteurs ; cependant Danilewsky a constaté qu'à certains moments ces animaux deviennent malades et peuvent même succomber ; leur sang renferme alors des corps en marguerite.

Les oiseaux ne sont pas sensibles à l'inoculation de l'hématozoaire humain ; on peut, au contraire, les infecter en leur inoculant le sang d'un oiseau de même espèce contenant des hématozoaires (Celli et San Felice, Laveran).

L'inoculation, dans les veines de l'homme, de sang de pigeon infecté n'a donné aucun résultat entre les mains de Mattei.

La quinine, active vis-à-vis de l'hématozoaire de l'homme, est sans action sur les hématozoaires des oiseaux.

Technique. — Le sang est obtenu par une piqûre faite avec une épingle à une des veines du pli de l'aile, après avoir enlevé quelques plumes. Le sang est recueilli avec une pipette.

Les lamelles de sang sont préparées et traitées comme nous l'avons dit à propos de l'Hématozoaire du paludisme (Voy. p. 620).

Le calfat (*Padda oryzivora*) constitue une exellente espèce pour l'étude des hématozoaires des oiseaux, il se trouve facilement chez les marchands d'oiseaux et son sang renferme l'hématozoaire trois fois sur quatre chez les sujets récemment arrivés de l'Indo-Chine (Laveran).

LES HÉMATOZOAIRES DES VERTÉBRÉS A SANG FROID.

On rencontre des hématozoaires dans le sang d'un grand nombre de vertébrés à sang froid : tortue, lézard, grenouille, salamandre, triton, etc. Nous décrirons les mieux connus.

HŒMOGREGARINA STEPANOWI.

Découvert par Danilewsky chez la tortue d'eau (*Cistudo europæa*), cet hématozoaire est très fréquent chez la tortue adulte, particulièrement au printemps et en été.

I. — Dans le sang de la grande circulation, Laveran décrit deux formes parasitaires :

1° Éléments réniformes, endoglobulaires, à extrémités arrondies, mesurant 10 à 14 μ de long, présentant des granulations et un noyau vers leur partie moyenne, ne renfermant jamais de pigment. Le noyau, à l'état frais, apparaît comme un espace clair arrondi ou ovalaire ; il se colore plus fortement que le protoplasma par le bleu de méthylène. Cette forme parasitaire prédomine dans le sang de certaines tortues.

2° Vermicules presque toujours repliés sur eux-mêmes et endoglobulaires. Cette forme dérive de la précédente : quand un élément réniforme a atteint une longueur de 10 μ environ, il se forme à une de ses extrémités un segment en retour sur le premier, ce second segment augmente peu à peu de longueur, d'où l'aspect vermiculaire du parasite.

Les vermicules repliées mesurent de 15 à 18 μ de long, l'un des segments se termine par une extrémité renflée, l'autre par une extrémité effilée ; le noyau siège d'ordinaire au niveau de la courbure ; il est tantôt ramassé, tantôt allongé ou en besace, rarement il se divise en deux parties indépendantes ; il est surtout visible dans les préparations colorées. Les vermicules ne renferment jamais de pigment.

Lorsque le sang est fixé rapidement après sa sortie des vaisseaux, on ne trouve que des vermicules endoglobulaires ; mais dans les préparations de sang frais conservées pendant une heure environ, on voit des vermicules libres et mobiles. Leurs mouvements sont assez vifs et variés ; pendant la progression, il se forme souvent des étranglements qui débutent à la partie antérieure du parasite et semblent glisser comme des anneaux vers la partie postérieure.

II. — Les formes de reproduction du parasite se rencontrent dans la moelle osseuse (Danilewsky) et surtout dans le foie (Laveran).

D'après Laveran, les formes qui correspondent à la phase de reproduction sont constituées par des éléments ovoïdes, mesurant 10 à 16 μ de long, d'abord endoglobulaires, puis libres ; ils contiennent des granulations de chromatine prenant fortement le bleu de méthylène et plusieurs noyaux, disposés par groupes de trois ou quatre à chaque extrémité. Plus tard, les contours des éléments embryonnaires se dessinent, le corps ovoïde se segmente, soit régulièrement, soit en forme de barillet. Mis en liberté, les éléments embryonnaires, libres ou endoglobulaires, sont allongés, parfois un peu recourbés, renflés à une extrémité, effilés à l'autre ; ils possèdent un noyau dans l'extrémité renflée. Les éléments libres sont doués de mouvements qui leur permettent de s'introduire dans les hématies.

Les formes de reproduction se rencontrent également, mais plus rarement, dans les frottis de rate.

Les formes de reproduction de *H. Stepanowi* décrites par Laveran sont assez rares, ce qui explique que le parasite soit très peu pathogène ; elles correspondent à la reproduction endogène du parasite ; on ne connaît

pas de reproduction exogène; la maladie ne se communique pas des animaux malades aux animaux sains : les tortues infectées n'éliminent pas de spores durables. « Les tortues s'infectent probablement par les voies digestives, il faudra donc étudier les parasites des animaux dont elles se nourrissent (Laveran). »

Technique. — Laveran recommande la technique suivante:

a. *Sang.* — Se procurer le sang en coupant l'extrémité de la queue. Examiner le sang à l'état frais et après fixation (dessiccation rapide suivie du traitement par l'alcool-éther) et coloration (éosine et bleu de méthylène, comme plus bas).

b. *Organes.* — La méthode des coupes donne des résultats peu satisfaisants ; le procédé suivant est à recommander :

1° Préparer avec l'organe à examiner un léger frottis sur lamelle ;

2° Déposer la lamelle, avant dessiccation, dans un verre de montre rempli d'une solution saturée d'acide picrique ; laisser en contact trente minutes; laver à l'eau ;

3° Colorer par un séjour de six à douze heures dans le mélange suivant récemment préparé :

Solution aqueuse saturée de bleu de méthylène...	2 centimètres cubes.
Eau distillée..................................	4 —
Solution aqueuse d'éosine à 1 p. 100...........	8 gouttes.

4° Laver à l'eau, déshydrater rapidement par l'alcool absolu, monter dans le baume.

DREPANIDIUM RANARUM.

Labbé décrit chez la grenouille (*Rana esculenta*) deux espèces de drepanidiums : *Dr. princeps* et *Dr. monilis*. Laveran croit que ces deux formes parasitaires ne constituent qu'une seule espèce à laquelle il conserve le nom de *Dr. ranarum* (Lankester). Le parasite ne s'observe guère qu'en été et au commencement de l'automne.

I. — Dans le sang, le parasite adulte a l'aspect d'un vermicule, long de 12 à 15 μ et animé de mouvements vifs et variés; à l'état de repos, l'extrémité antérieure est arrondie, la postérieure effilée, mais pendant les mouvements l'extrémité antérieure s'amincit également, ce qui permet au parasite de pénétrer et traverser les hématies ; pendant les mouvements, le Drepanidium peut présenter un ou deux étranglements qui naissent à la partie antérieure et semblent glisser vers la partie postérieure. Le noyau est situé vers la partie moyenne. A l'extrémité postérieure du parasite, on voit souvent un appendice d'aspect variable, représentant vraisemblablement des débris de l'hématie dans laquelle s'est développé le Drepanidium ou de la membrane qui enveloppait le parasite endoglobulaire.

Les parasites jeunes endoglobulaires forment de petits éléments de forme variable, mesurant 4 à 8 μ dans leur plus grand diamètre et possédant un

noyau et des granulations; plus tard le parasite s'allonge en s'incurvant parfois. On peut rencontrer deux parasites dans le même globule rouge; on rencontre également le Drepanidium dans les leucocytes.

II. — Les formes de reproduction ne s'observent jamais dans le sang de la grande circulation, on doit les étudier dans les frottis de rate.

La rate renferme de nombreux parasites, même quand ceux-ci sont rares dans le sang. Les formes de reproduction sont constituées par des éléments sphériques ou irréguliers, de 4 à 8 μ de diamètre, contenant chacun deux à six noyaux de chromatine colorés en violet foncé par l'hématéine; elles présentent une grande analogie avec celles de *Hæmogregarina Stepanowi*; elles constituent une phase endogène de reproduction; l'existence d'une forme correspondant à la reproduction exogène des Coccidies ne semble pas probable (Laveran).

TECHNIQUE. — Recueillir le sang en sectionnant un doigt de l'une des pattes; pour le reste, appliquer la technique décrite à propos de *Hæmogregarina Stepanowi*.

HÉMATOZOAIRES DU LÉZARD.

Dans le sang des lézards (*Lacerta viridis*, *L. agilis*, etc.), on observe fréquemment des hématozoaires, décrits par Danilewsky, Chalachnikoff, Labbé, sous les noms de *Hæmogregarina lacertarum*, *Danilewskya Lacazei*, etc.

Les éléments parasitaires jeunes, endoglobulaires, sont arrondis ou ovalaires, puis ils s'allongent pour former des vermicules, mesurant environ 10 μ de long, plus ou moins incurvés et possédant un noyau. La destruction des hématies envahies met les vermicules en liberté; ceux-ci présentent alors des mouvements variés qui peuvent s'accompagner de la production d'étranglements annulaires. Les formes de reproduction ne se rencontrent pas dans le sang de la circulation générale.

TECHNIQUE. — On obtient le sang en coupant l'extrémité de la queue du lézard; les lamelles sont traitées et colorées comme il est dit plus haut.

LES HÉMATOZOAIRES DES MAMMIFÈRES.

Des hématozoaires ont été décrits chez un certain nombre de mammifères: chez le bœuf (*fièvre du Texas*, H. Smith et Kilborne), le mouton (Bonome, Laveran et Nicolle), le chien (Piana et Galleri-Valerio), les Cheiroptères (Grassi et Feletti, etc.). Nous décrirons l'Hématozoaire de la fièvre du Texas et celui du mouton.

PYROSOMA BIGEMINUM.

Pyroplasma bigeminum.

Smith et Kilborne ont décrit sous ce nom le parasite de la fièvre du Texas des bovidés. Ce parasite a été étudié par Krogius et O. von Hellens, sur des bœufs de Finlande atteints d'hémoglobinurie, par Laveran et Nicolle dans le sang de bœufs de Crimée importés à Constantinople.

Symptômes et lésions. — La fièvre du Texas revêt tantôt une forme aiguë, tantôt une forme subaiguë ou atténuée. La forme aiguë, qui se manifeste surtout en été, est le plus souvent mortelle; la température s'élève, l'urine est rougeâtre, albumineuse, contient souvent de l'albumine, il existe de l'inappétence, de la constipation, la rumination est suspendue, le sang devient fluide et très pâle, l'animal maigrit, présente parfois des symptômes nerveux (délire, parésies), et la mort arrive au bout de quelques jours; rarement la guérison survient, les rechutes sont fréquentes.

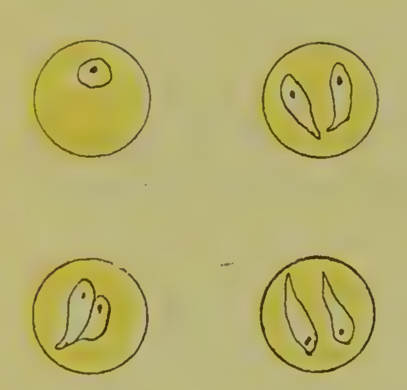


Fig. 267. — *Pyrosoma bigeminum.*

La forme subaiguë survient de préférence en automne, elle peut être méconnue si l'on ne pratique pas l'examen du sang; la fièvre est moins vive, les symptômes moins marqués, il n'existe pas d'hémoglobinurie.

A l'*autopsie* des animaux ayant succombé à la fièvre du Texas, on trouve fréquemment des ecchymoses sous-cutanées; la rate est volumineuse, le tissu périrénal œdématié, les reins volumineux et congestionnés; il existe parfois des noyaux d'hépatisation pulmonaire.

Le nombre des globules rouges a considérablement diminué, on trouve de nombreuses hématies augmentées de volume, le nombre des leucocytes s'accroît parfois.

Étiologie. — Des recherches de Smith et Kilborne et de Koch il résulte que la maladie est propagée par les tiques (*Boophilus bovis*). Si on enlève toutes les tiques du corps d'un animal provenant d'une région infectée, cet animal n'est pas susceptible de donner la fièvre du Texas quand on le transporte dans une région non infectée ; si l'on place des tiques prises sur des bœufs malades dans des champs où paissent des bœufs sains, ces animaux ne tardent pas à présenter les symptômes de la fièvre du Texas. Cependant on a toujours échoué à rencontrer le parasite chez les tiques.

Aspect dans le sang. — Laveran et Nicolle, dans le sang de la grande circulation, ont presque toujours rencontré le parasite à l'état endoglobulaire, sous deux aspects principaux:

1° Petits éléments sphériques ou ovalaires, dont les plus petits mesurent à peine 1 µ de diamètre ; après coloration on y distingue un karyosome arrondi ou ovalaire situé d'ordinaire à la périphérie.

La même hématie peut contenir deux parasites. Dans les éléments plus volumineux, le karyosome s'allonge, puis se divise en deux parties, d'abord accolées puis situées aux extrémités d'un des diamètres; le protoplasma se divise alors (fig. 267).

Entre les éléments sphériques et les éléments piriformes existent une série de formes intermédiaires.

2° Éléments piriformes, géminés, mesurant 2,5 à 3,5 μ de long. D'ordinaire les extrémités effilées des deux éléments logés dans la même hématie sont continues ou contiguës ; on peut aussi observer des éléments complètement séparés dont les extrémités effilées sont souvent tournées en sens inverse. Après coloration on voit, dans l'extrémité renflée, un karyosome arrondi ou ovalaire parfois entouré d'une zone claire; du côté de l'extrémité effilée, on observe une agglomération de granulations (fig. 267).

Parfois une hématie contient quatre éléments piriformes, ce qui peut s'expliquer, soit par l'envahissement du globule par deux parasites qui se sont divisés en deux, soit par la division en quatre parties d'un seul parasite.

Les éléments piriformes sont beaucoup plus nombreux que les formes rondes ou ovalaires, dans le sang de la grande circulation.

Aspect dans les frottis de rate. — Les éléments libres sont beaucoup plus nombreux que dans le sang de la grande circulation ; les petits éléments arrondis ou ovalaires dominent.

« Il nous paraît probable que le foyer principal de la reproduction endogène du *Pyrosoma bigeminum* est dans la rate; les petits éléments se multiplient dans ce viscère et, grâce aux mouvements amiboïdes dont ils sont doués, ils pénètrent dans les hématies où ils subissent encore une division en deux, plus rarement en quatre (Laveran et Nicolle). »

Technique. — On étudie le sang à l'état frais ou après dessiccation.

Laveran et Nicolle indiquent la technique suivante :

1° Fixer les lamelles à 110° pendant quelques minutes, puis par la solution aqueuse saturée de sublimé, pendant une minute.

2° Colorer dans le mélange éosine-bleu de Laveran (pendant une à deux heures), laver, traiter par le tannin, et terminer comme il a été dit page 622. Avant de monter dans le baume, s'assurer que la coloration n'est pas trop forte : dans ce cas on décolorerait par l'alcool absolu. Les noyaux des parasites doivent être colorés en rouge violacé.

PYROSOMA OVIS.

Pyroplasma ovis.

A été décrit par Laveran et Nicolle dans une épizootie qui a sévi sur un troupeau de moutons à Constantinople.

Les animaux malades présentaient de la fièvre, de la diarrhée, de l'œdème sous-maxillaire ; ils guérissaient ou succombaient en deux à trois jours. A l'autopsie, les tissus avaient un aspect œdémateux, le sang était fluide et rosé, les ganglions et la rate tuméfiés. Le sang et la pulpe splénique contenaient de nombreux hématozoaires (1).

Aspect dans le sang. — Parasites d'ordinaire endoglobulaires, arrondis ou allongés, mesurant 1 μ à 1,5 μ de diamètre, jamais pigmentés, contenant un karyosome arrondi situé d'ordinaire à la périphérie ; certains éléments endoglobulaires sont en voie de division, le karyosome s'allonge puis se sépare en deux parties, le protoplasma se divise ensuite.

Aspect dans les frottis de rate. — Éléments plus nombreux que dans le sang de la grande circulation, mais présentant le même aspect ; on trouve des parasites un peu plus grands et les formes en voie de division sont plus communes que dans le sang de la grande circulation.

Technique. — Même technique que pour *Pyrosoma bigeminum.*

Article VII. — **LES GRÉGARINES.**

Les Grégarines vivent en parasites dans le tube digestif et la cavité générale des animaux invertébrés et particulièrement des articulés.

Les Grégarines, à l'état adulte, ont la forme d'un sac plus ou moins allongé (10, 20 μ à 16 millimètres) et constitué par une membrane d'enveloppe continue (*épicyte*) et un contenu. Le corps des Grégarines peut être formé par un ou par deux segments nettement séparés, d'où les deux groupes des *Monocystidés* et des *Dicystidés*. Chez ces derniers, les deux segments sont d'ordinaire inégaux ; le segment antérieur, *tête* ou *protoméride*, porte chez certaines espèces un appendice fixateur, caduc, l'*épiméride* ; le segment postérieur, *corps* ou *deutoméride*, contient le *noyau*.

(1) Laveran et Nicolle pensent que cette affection est identique à l'épizootie connue en Roumanie sous le nom de *Carceag* et attribuée par Babès à un *hematococcus*. Il est plus difficile d'affirmer qu'il y a identité entre ces maladies et les épizooties étudiées par Bonome aux environs de Padoue et dans lesquelles l'existence d'un hématozoaire endoglobulaire a été constatée chez les animaux atteints.

L'épicyte présente fréquemment des stries longitudinales constituées par des myonèmes ; les stries transversales sont plus rares.

Le contenu protoplasmique renferme en général de nombreuses granulations chromatiques ; le noyau, ordinairement unique, est sphérique ou ovoïde, il possède un ou plusieurs nucléoles.

Les Grégarines munies d'un épiméride restent plus ou moins longtemps fixées par cet appendice à une cellule épithéliale de leur hôte, puis l'épiméride se détache et le parasite devient libre.

Les Grégarines sont douées de mouvements variés, mouvements de translation et mouvements de flexion ; ces derniers sont limités au deutoméride et sont accompagnés de contractions actives du protoplasma.

A un moment donné les Grégarines s'enkystent ; cet enkystement est tantôt solitaire, tantôt précédé de l'accolement de deux individus.

Pour cette conjugaison, les deux individus se juxtaposent par leur extrémité de même nom chez les Monocystidés (sauf quelques exceptions), par leur extrémité de nom contraire chez les Dicystidés. Parfois, il se forme ainsi des chaînes de plusieurs éléments. On peut voir l'extrémité de l'un des individus s'enfoncer dans celle de l'autre en l'invaginant en doigt de gant ; chez *Gonospora longissima* (parasite de *Dodecaceria concharum*) Caullery et Mesnil ont constaté que la cloison de séparation entre les deux individus accolés était détruite et qu'il y avait fusion des protoplasmas.

Au moment de l'enkystement, la cloison qui, chez les Dicystidés, sépare l'épiméride du deutoméride disparaît, le corps devient sphérique ou ellipsoïde, s'entoure d'une membrane plus ou moins épaisse, le protoplasma forme une seule masse granuleuse, le noyau s'efface. Quand il y a eu conjugaison, les deux individus peuvent se confondre pour former un seul kyste dans lequel les deux individus restent souvent distincts ; parfois aussi, après être restés un certain temps accolés, les deux parasites se séparent pour former deux kystes distincts.

Parfois les kystes continuent sur place leur évolution, dans l'organisme où les parasites ont vécu (Grégarines cœlomiques) ; plus fréquemment, les kystes qui se forment dans le tube digestif sont rejetés au dehors et achèvent leur évolution hors de l'hôte primitif.

Les *spores* se forment dans le kyste ; le plus souvent le protoplasma se divise en deux masses égales, puis ces masses se fusionnent de nouveau et les spores se forment par une sorte de bourgeonnement simultané : à la surface de la masse protoplasmique apparaissent de petites vésicules claires, sphériques ; le kyste se remplit de ces vésicules, puis celles-ci se transforment en *navicelles*

en prenant une forme ovalaire et en s'entourant d'une substance claire terminée à chaque extrémité par un prolongement en pointe. A un moment donné, les navicelles reprennent leur forme sphérique et s'accumulent contre la paroi interne du kyste pour y former une couche périphérique plus ou moins épaisse ; le centre du kyste contient un liquide avec de nombreuses granulations ; plus tard enfin, les spores gagnent de nouveau le centre du kyste où elles achèvent leur formation.

A la maturité, les spores sont mises en liberté par déhiscence du kyste ; cette déhiscence peut se faire suivant différents modes plus ou moins compliqués. Les spores mises en liberté sont arrondies ou affectent la forme d'un navicule ou d'un barillet (la forme des spores sert de caractères pour l'établissement des genres). Le contenu de la spore se partage en un reliquat sporal et en un certain nombre (quatre à huit ordinairement) de *corpuscules falciformes* ou *sporozoïtes* renfermant chacun un noyau. L'infestation se produit par les spores, dans le tube digestif de l'hôte. La déhiscence de la spore met les *sporozoïtes* en liberté ; grâce à leurs mouvements, ceux-ci vont se fixer sur les cellules épithéliales de l'intestin, et donnent naissance à des corps amiboïdes qui se transforment progressivement en Grégarines.



Fig. 268. — Grégarine géante du homard. — A droite, forme adulte ; à gauche, formes de l'animal aux différentes phases de développement depuis le stade amiboïde jusqu'à la forme adulte (d'après V. Beneden).

La figure 268 montre : à droite une Grégarine adulte, à gauche les différents aspects que prend l'animal depuis la forme amiboïde jusqu'à la forme adulte.

Des recherches de Caullery et Mesnil il résulte que certaines

Grégarines possèdent une phase de *multiplication asporulée* ou *endogène* étendant l'infection dans l'intérieur d'un même hôte : chez *Gonospora longissima*, les sporozoïtes des spores, mis en liberté dans le tube digestif de l'annélide hôte, pénètrent dans une cellule épithéliale de l'intestin ; dans cette cellule le sporozoïte donne naissance à un petit corps sphérique nucléé; bientôt le corps s'accroît, son noyau se divise et l'on voit deux à quatre noyaux groupés vers un pôle ; la figure prend alors l'aspect d'un barillet formé par six à huit croissants accolés, possédant un noyau ; puis les croissants sont mis en liberté et constituent de nouveaux sporozoïtes qui pénètrent dans la cavité cœlomique de l'hôte.

CHAPITRE XXXVII

LES PROTOZOAIRES PARASITES (SUITE)

INFUSOIRES

Les *Infusoires* sont des protozoaires libres, pourvus d'une membrane d'enveloppe traversée par des *flagella*, ou des *cils vibratiles*, ou des *tentacules*. Les deux classes des I. flagellifères et des I. ciliés sont les seules qui nous intéressent.

ARTICLE I. — INFUSOIRES FLAGELLIFÈRES.

Ce sont des infusoires dont l'appareil locomoteur est essentiellement constitué par de longs filaments contractiles, dits *flagella* ou *fouets*. Nous étudierons les *Trypanosoma*, *Trichomonas* et *Lamblia*.

TRYPANOSOMA.

Les *Trypanosomes* (Gruby) vivent à l'état de parasites dans le sang d'un grand nombre d'animaux ; on ne les a jamais rencontrés chez l'homme. Ce sont des infusoires possédant une membrane ondulante fixée le long du corps, un ou plusieurs flagella et un noyau.

Technique. — On recherche les Trypanosomes par les procédés que nous avons indiqués à propos des Hématozoaires ; le procédé de coloration de Laveran donne, en particulier, de fort belles préparations.

LES TRYPANOSOMES DES OISEAUX.

Découverts par Weld, ils ont été décrits par Danilewsky dans le sang de la chouette, du rollier, etc. On les rencontre dans le sang et la moelle osseuse. Ils sont constitués par un corps fusiforme, grisâtre, possédant un noyau sphérique, et dont l'extrémité antérieure se termine par un flagellum plus ou moins long ; une membrane ondulante, hyaline, s'étend du flagellum à l'extrémité postérieure du parasite. Le Trypanosome est animé d'un mouvement

spiraliforme, le flagellum étant dirigé en avant. La longueur du Trypanosome varie de 18 à 60 μ, non compris le flagellum (fig. 269).

Reproduction. — La reproduction s'opère par deux processus différents :

I. — A un moment donné, le Trypanosome prend la forme amiboïde, le flagellum et la membrane ondulante se rétractent, le parasite devient sphérique et il entre en segmentation. Les éléments provenant de la segmentation des corps amiboïdes sont sphériques et munis d'un noyau, puis ils s'allongent, deviennent piriformes, leur extrémité antérieure s'étire en un flagellum très mobile, leur extrémité postérieure est plus ou moins effilée (*trypanomonas* de Danilewsky). Les trypanomonas peuvent eux-mêmes se multiplier par division longitudinale ; cette division commence toujours par l'extrémité antérieure de l'animal. (Ces formes se rencontrent peu dans le sang périphérique, mais elles sont fréquentes dans la rate et la moelle osseuse.) Après une période de temps assez longue, les trypanomonas prennent la forme du Trypanosome.



Fig. 269. — Trypanosome des oiseaux (d'après Danilewsky).

II. — Parfois aussi le Trypanosome se reproduit par simple division longitudinale, le noyau se divise, puis la segmentation du protoplasma débute par l'extrémité antérieure de l'animal.

Les Trypanosomes peuvent vivre cinq à huit jours dans du sang conservé purement dans une pipette ; dans les mêmes conditions, les trypanomonas vivent dix à douze jours.

LES TRYPANOSOMES DES GRENOUILLES.

Undulina ranarum. — Trypanosoma sanguinis.

Ces Trypanosomes ont été étudiés par Gluge, Mayer, Gruby, Ray-Lankester, etc. ; on les rencontre, surtout en été, chez *Rana esculenta*, *Rana viridis*, *Hyla viridis*, *Bufo vulgaris*.

Chalachnikow en a distingué plusieurs variétés : les unes ont une forme plate, les autres sont disposées en éventail ou en corne d'abondance, le flagellum se trouvant à une des extrémités du bord ondulé.

Les Trypanosomes de la grenouille présentent un état amiboïde très net : le Trypanosome se transforme en un corps amiboïde qui se segmente en quatre à huit parties pour donner de jeunes éléments fusiformes qui peuvent à leur tour se multiplier par division longitudinale.

LES TRYPANOSOMES DES POISSONS.

Hœmatomonas Cobitis. — Hœmatomonas Carassii.

Découverts par Valentin dans le sang de *Salmo fario*, ils ont été observés par Remak, Mitrophanow, Danilewsky, Chalachnikow, etc., chez *Cobitis fossilis*, *Carassius vulgaris*, *Cyprinus carpio*, *Perca fluviatilis*, etc.

Chalachnikow distingue deux variétés de parasites : l'une est analogue au Trypanosome des oiseaux, l'autre est plate, étalée comme le Trypanosome de la grenouille. Ces deux formes ne sont probablement que deux aspects du même parasite (fig. 270).



Fig. 270. — Trypanosome des poissons (d'après Chalachnikow).

La reproduction a lieu comme chez les Trypanosomes des oiseaux : le flagellum disparaît, le corps amiboïde ainsi formé se segmente et produit des trypanomonas qui prennent ensuite la forme adulte et peuvent se multiplier par division longitudinale.

LES TRYPANOSOMES DES MAMMIFÈRES.

On a observé des trypanosomes chez les rongeurs (rats, hamsters, lapins, cobayes), les chevaux, les mulets, les chameaux, etc.

LE TRYPANOSOME DU RAT.

Herpetomonas Lewisii. — Trypanosoma Lewisii.

Ce parasite a été découvert par Gros et Chaussat (mulot, taupe, rat noir) et observé par Lewis, Crooskshand, Danilewsky, Chalachnikow, Kempner et Rabinowitch, chez *Mus decumanus*, *Mus rufescens*, *Cricetus frumentarius*, etc.

Dans le sang frais, le Trypanosome du rat est aplati, fusiforme, souvent enroulé sur lui-même ; il possède un noyau ou *peloton chromatique* et un nucléole ; une de ses extrémités se termine par un flagellum.

Dans les préparations fixées par l'acide osmique ou l'alcool-éther, on voit une des extrémités du parasite se terminer par un prolongement tranchant, l'autre, par un long flagellum ; sur les bords, la membrane ondulante forme une série de replis.

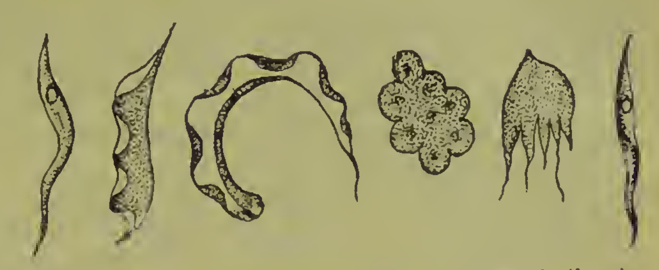


Fig. 271. — Trypanosome du rat (d'après Chalachnikow).

Chalachnikow est arrivé à cultiver le Trypanosome du rat dans du sang de chien recueilli purement; il a constaté que la reproduction de ce parasite se fait de la même façon que chez les Trypanosomes des oiseaux : formation de *corps amiboïdes* ou *pseudo-leucocytes*, division de ces corps en éléments jeunes ou trypanomonas ; parfois les corps amiboïdes se divisent longitudinalement en prenant l'aspect



Fig. 272. — Reproduction du Trypanosome du rat (d'après Kempner et Rabinowitch). — 1, Trypanosome adulte ; 2, division longitudinale ; 3, division transversale ; 4, corps amiboïde en segmentation ; 5, éléments jeunes mis en liberté.

d'un peigne dont chaque dent correspond à un trypanomonas ; bientôt après ces trypanomonas se séparent. Kempner et Rabinowitch ont confirmé les recherches de Chalachnikow ; la reproduction a lieu, soit par formation de corps amiboïdes qui se segmentent en rosace, soit par simple division longitudinale ou transversale des trypanosomes adultes (fig. 272).

LE TRYPANOSOME DU LAPIN ET DU COBAYE.

Jolyet et de Nabias, à Bordeaux, ont rencontré des trypanosomes, quatre fois sur dix, dans le sang du lapin ; le plus souvent, les lapins parasités étaient amaigris, chétifs et présentaient de la diarrhée. Kunstler a observé un parasite semblable dans le sang du cobaye. Ces trypanosomes sont allongés : leur longueur totale, y compris le flagellum, est de 30 à 36 μ ; leur corps, cylindrique à sa partie moyenne, s'effile en avant et se termine, à sa partie postérieure, par un flagellum ; la membrane ondulante est très étroite et visible seulement après coloration ; il existe un noyau. Dans le sang frais, les parasites se meuvent avec une grande rapidité.

LE TRYPANOSOME DE LA SURRA.

Trypanosoma Evansii.

Griffith Evans a décrit une maladie, la *Surra*, qui sévit dans l'Inde sur les équidés et les chameaux ; cette maladie a les caractères d'une fièvre rèmittente et est causée par un hématozoaire.

Ce trypanosome, désigné par Steel sous le nom de *Spirochœta Evansii*, a été étudié par Lewis qui l'identifie avec le Trypanosome du rat (*Herpetomonas Lewisii* de Danilewsky) ; les mêmes caractères morphologiques appartiennent aux deux parasites. Steel et Evans ont réussi à inoculer la maladie au chien, au cheval et au mulet.

LE TRYPANOSOME DE LA NAGANA.

Trypanosoma Brucei.

D. Bruce a montré que la *Nagana*, ou maladie de la « mouche Tsétsé » (*Glossina morsitans*) est produite par un trypanosome.

La Nagana frappe, dans l'Afrique australe, le cheval, l'âne, le bœuf, le chien, etc.; tous les animaux atteints succombent. Le Trypanosome de la Nagana est analogue à celui de la Surra : il y a peut-être identité entre les deux maladies.

LE TRYPANOSOME DE LA DOURINE.

Trypanosoma Rougeti.

Le Trypanosome de la Dourine a été découvert par Rouget, à Constantine, dans le sang d'un étalon atteint de *mal du coït* ; il a été étudié depuis par Schneider et Buffard.

Le mal du coït s'observe chez les animaux qui viennent de s'accoupler :

la transmission ne s'effectue que par le coït. L'étalon atteint présente à la croupe et sur les membres postérieurs des tuméfactions circulaires, non confluentes ; le fourreau est tuméfié, œdématié, les mouvements sont difficiles. Cette première période est marquée, chez la jument, par une tuméfaction indolore de la vulve et du vagin, bientôt accompagnée d'un flux muqueux abondant, puis apparaissent les tumeurs cutanées. A la seconde période, chez l'étalon et chez la jument se manifestent des paralysies partielles et parfois des accès épileptiformes ; la mort survient d'ordinaire ; s'il y a guérison, la convalescence est longue et les rechutes sont fréquentes

Morphologie. — Le Trypanosome de Rouget est fusiforme, sa partie postérieure s'allonge en flagellum, il est pourvu sur l'un de ses bords d'une membrane ondulante plus ou moins plissée, et possède un noyau réfringent situé vers son extrémité antérieure. Ses dimensions sont de 20 à 30 μ de long sur 2 à 3 μ de large vers la partie moyenne du corps. Il est extrêmement mobile; la mobilité persiste encore dans les préparations de sang frais au bout de dix-huit heures (fig. 273).



Fig. 273. — Trypanosome de la Dourine (d'après Rouget).

D'après Schneider et Buffard, le Trypanosome de Rouget exerce sur les hématies une « action traumatique très nette » ; il se fixe par une de ses extrémités, d'ordinaire l'antérieure, à un globule rouge qu'il agite en tous sens ; dans les préparations, on rencontre de nombreux fragments de globules rouges.

Cultures. — Tous les essais de cultures dans le sang des animaux réceptifs ont échoué (Rouget).

Dans le sang, hors des vaisseaux, le parasite perd sa virulence au bout de quelques heures.

Inoculations. — Les animaux à sang froid, les oiseaux, le cobaye sont réfractaires.

La souris, le rat blanc, le lapin, le chien, le cheval, le mulet sont réceptifs.

L'inoculation aux animaux réceptifs se fait très aisément par injection d'une trace de sang infesté sous la peau, dans le péritoine et dans les veines; il suffit même de déposer une goutte de sang infesté sur une excoriation superficielle de la peau ou sur une

muqueuse non excoriée pour déterminer l'infestation. L'absorption par les voies digestives est toujours restée inactive. Dans un cas, le sperme d'un lapin contenait le parasite et l'animal a pu contaminer par la voie génitale une femelle neuve (Rouget).

Souris. — Le parasite se généralise rapidement; les souris succombent en cinq à onze jours, les Trypanosomes fourmillent dans le sang et la pulpe des viscères.

Lapin. — Chez le lapin infesté, le Trypanosome ne se rencontre pas constamment dans le sang, mais y apparaît d'une manière intermittente; il se produit une fièvre irrégulière, sans qu'il existe aucune relation entre les paroxysmes fébriles et la présence du Trypanosome dans le sang; l'animal présente des symptômes caractéristiques : œdème et escarres des oreilles, conjonctivite muco-purulente, tuméfaction et escarres des organes génitaux externes, paraplégie, cachexie et mort au bout de deux à quatre mois.

Cheval. — Vers le quatrième jour après l'inoculation sous-cutanée, il se produit de l'infiltration œdémateuse du tissu cellulaire, au point d'inoculation. L'exsudat contient de nombreux leucocytes et des trypanosomes peu mobiles et plus larges que les parasites observés dans le sang; vers le sixième jour, on constate la division en deux ou trois amas du noyau des trypanosomes; puis l'œdème augmente rapidement, il se forme une véritable tumeur contenant une sérosité sanguinolente dans laquelle on rencontre : 1° des trypanosomes analogues à ceux que nous venons de décrire; 2° des corps volumineux, piriformes, immobiles, pourvus d'appendices reproduisant l'aspect de segments postérieurs de trypanosome : cette forme en V, *en peigne* ou *en poulpe,* correspond à la segmentation longitudinale de l'animal; elle est analogue aux figures que donne le Trypanosome du rat (Voy. fig. 271 et 272); 3° des trypanosomes groupés par deux ou par quatre, rayonnant autour d'un point central formé par la confluence de leurs extrémités antérieures, constituant un aster et représentant un stade plus avancé de la segmentation longitudinale.

D'après Schneider et Buffard, on ne constaterait jamais de reproduction par segmentation transversale, ni par formation de corps amiboïdes en rosaces.

Du huitième au dixième jour les parasites diminuent; bientôt la tumeur s'affaisse et les parasites disparaissent : le cycle évolutif du Trypanosome dure environ une semaine.

Dès ce moment on trouve les parasites dans le sang de la circulation générale et dans les lésions œdémateuses ou thrombosiques qui ne tardent pas à se produire.

Schneider et Buffard pensent que les plaques dourineuses sont dues à la pullulation secondaire de l'hématozoaire : arrêtés dans les capillaires du derme, les parasites s'y divisent, s'y multiplient, puis les formes jeunes nées de cette division réensemencent le torrent circulatoire; « les foyers de ramollissement et les foyers hémorragiques dans les centres nerveux sont également produits par la migration du Trypanosome dans les vaisseaux médullaires qu'il obture et qu'il perfore ».

Ane. — L'âne est moins réceptif que le cheval, la succession des formes est moins régulière, l'engorgement prend d'emblée des proportions considérables ; dès que la tumeur s'affaisse, le parasite pénètre dans la circulation générale ; d'abord abondant dans les vaisseaux, le Trypanosome y devient bientôt de plus en plus rare ; à ce moment, six à huit jours après l'apparition de la première, une seconde tuméfaction se produit au point d'inoculation ; le parasite y pullule de nouveau et cause bientôt une nouvelle infection sanguine. La maladie a une marche nettement intermittente et le parasite ne se reproduit qu'au point d'inoculation.

Chien. — Le chien est très réceptif. L'engorgement initial persiste plus longtemps ; le parasite ne pénètre dans les vaisseaux que du quinzième au vingtième jour; il est probable que la multiplication se fait, dès ce moment, dans tous les organes.

Les troubles oculaires dominent (conjonctivite, kératite, hypopion); on observe de l'œdème des organes génitaux externes et des paralysies.

TRICHOMONAS VAGINALIS.

Cercomonas intestinalis. — Trichomonas intestinalis.

On s'accorde généralement aujourd'hui à rapporter à un seul genre les parasites décrits sous les noms de *Cercomonas hominis* (Davaine), *Cercomonas intestinalis* (Lambl), *Trichomonas intestinalis* (Leuckart), etc. Avec Blanchard nous réunirons ces parasites sous le nom de *Trichomonas vaginalis* (Donné).

Trichomonas vaginalis mesure 10 à 15 μ de long sur 7 à 10 μ de large ; sa forme est très variable, d'ordinaire piriforme, il s'effile, se renfle en boule, s'étrangle en sablier. La grosse extrémité, tournée en avant, porte quatre flagella présentant une même insertion et fréquemment agglutinés les uns aux autres ; de leur point d'insertion part une membrane ondulante peu élevée, plissée et festonnée, s'étendant jusqu'à l'extrémité postérieure de l'animal ; cette extrémité postérieure est le plus souvent munie d'un appendice caudal plus ou moins long. La bouche s'ouvre près de l'insertion des flagella, elle donne accès dans une cavité tubulaire creusée dans le protoplasma.

Le protoplasma est granuleux, il est entouré d'une fine membrane d'enveloppe et contient de petites vacuoles et un noyau arrondi ou allongé.

La reproduction a lieu par division longitudinale.

Trichomonas vaginalis a été découvert par Davaine dans des déjections cholériques ; on le retrouve fréquemment dans les selles diarrhéiques de malades atteints d'affections les plus diverses ; on l'a rencontré dans le liquide visqueux qui entourait une hydatide du foie (Lambl), dans des cas de gangrène pulmonaire, d'hydropneumothorax, etc. On le trouve fréquemment dans le vagin de vierges ou de femmes atteintes de vaginite, mais non dans le mucus vaginal normal ; on l'a rencontré dans la vessie de l'homme.



Fig. 274. — A, *Cercomonas intestinalis* (d'après Davaine). — B, *Trichomonas vaginalis*.

En résumé, *Trichomonas* ne semble pas pathogène : il se développe dans l'organisme quand une maladie antérieure lui a créé un terrain favorable ; peut-être la présence du parasite entretient-elle les lésions préexistantes. D'après Perroncito, le parasite pénètre dans le tube digestif par les eaux de boisson dans lesquelles il existe sous une forme enkystée.

Technique. — L'examen de ces parasites est rendu difficile par leur extrême mobilité, on ne peut en étudier les détails de structure qu'après fixation par l'acide osmique ou l'acide chromique, comme nous l'avons dit à propos des Amibes.

Il importe de rechercher le *T. intestinalis* dans les excréments encore chauds, cet être mourant rapidement quand les selles se refroidissent. On prendra dans cette recherche toutes les précautions que nous avons indiquées à propos des Amibes : s'il en est besoin, les selles seront diluées dans la solution de chlorure de sodium ou dans le liquide de Grassi tièdes (Voy. p. 598).

On peut s'exercer à l'étude de ces protozoaires en étudiant le *Cercomonas termo* qui abonde dans les infusions végétales.

Cercomonas termo. — Le *C. termo* (fig. 275) est constitué, à l'état jeune, par un corps ovoïde portant au niveau d'une de ses extrémités un long flagellum très mobile. Le protoplasma est granuleux, il est entouré d'une membrane d'enveloppe et contient un noyau sphérique colorable par le

carmin; dans la forme adulte, le corps prend une forme allongée, et, à côté du noyau, apparaissent de nombreuses vacuoles contractiles.

Les matières alimentaires sont introduites dans le protoplasma par un point déterminé situé à la base du flagellum; à cet endroit, la membrane d'enveloppe présente une interruption au niveau de laquelle le protoplasma renferme une vacuole où se rassemblent les particules alimentaires; puis la vacuole gagne le centre du protoplasma et les aliments y subissent la digestion. Les corps étrangers non alimentaires, qui ont été ingérés, sont rejetés par l'orifice qui a servi à leur introduction (Bütschli).



Fig. 275. — *Cercomonas termo.*

La reproduction a lieu par segmentation longitudinale; la bipartition commence par le noyau, puis le protoplasma se divise au voisinage du flagellum et la séparation des deux parties se produit graduellement; un flagellum se développe sur la moitié qui en était dépourvue.

LAMBLIA INTESTINALIS.

Ce parasite a été découvert par Lambl dans les mucosités mélangées à des selles d'enfants.

Depuis il a été rencontré fréquemment dans les selles ou le contenu intestinal d'individus bien portants ou atteints d'affections diverses, particulièrement chez les enfants ou les phtisiques; il habite de préférence le duodénum et le jéjunum. Les Lamblies ne semblent pas pathogènes; elles sont parfois si nombreuses dans l'intestin grêle qu'elles recouvrent une grande partie de la muqueuse : chez un malade atteint de catarrhe chronique de l'estomac, Moritz et Hölzl ont évalué à 18 milliards le nombre des individus évacués en vingt-quatre heures. Les Lamblies s'observent également chez le chien, le chat, le mouton, le lapin, etc.

Lamblia intestinalis mesure 10 à 16 μ de long sur 5 à 10 μ de large; elle est piriforme, sa grosse extrémité porte sur l'un de ses côtés une excavation en forme de ventouse; l'animal porte quatre paires de flagella, la première paire naît du pôle antérieur, la deuxième et la troisième au niveau de l'extrémité postérieure de l'excavation, la quatrième paire enfin s'insère sur la partie postérieure effilée de la Lamblie; ces flagella, longs de 7 à 14 μ, se portent en arrière et sont doués de mouvements variés.

Le protoplasma est légèrement granuleux; il est entouré d'une

fine membrane d'enveloppe qui s'épaissit en bourrelet autour de l'excavation en forme de ventouse; il contient un noyau transversal en forme d'haltère ou de fer à cheval.

Dans l'intestin, le parasite se pose à la surface des villosités et applique sa ventouse sur les cellules épithéliales; son extrémité caudale est alors dressée ou portée en avant. Dans l'intestin, la Lamblie se reproduit par scissiparité. La dissémination se fait au moyen de kystes ovales qui sont évacués avec les matières fécales; l'infestation se produit par l'eau de boisson ou les aliments souillés par les kystes. Calandruccio s'est infesté lui-même en avalant les kystes recueillis dans les selles d'un individu parasité; Perroncito, Grassi ont infesté de même des souris et des surmulots.

Recherche. — On emploiera la technique que nous avons exposée à propos des Amibes.

Article II. — **INFUSOIRES CILIÉS.**

BALANTIDIUM COLI.

Paramœcium coli.

Ce protozoaire se rencontre dans l'intestin et les matières fécales de l'homme et du porc. Il a été découvert et décrit par Malmsten; il semble cependant que Leeuwenhoek l'ait vu dans les matières fécales (fig. 276). On est peu fixé sur son rôle pathogène.

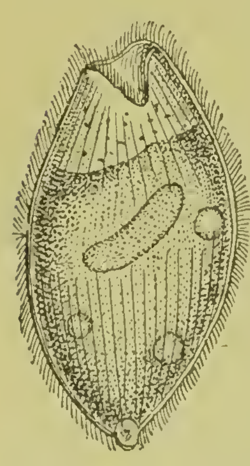
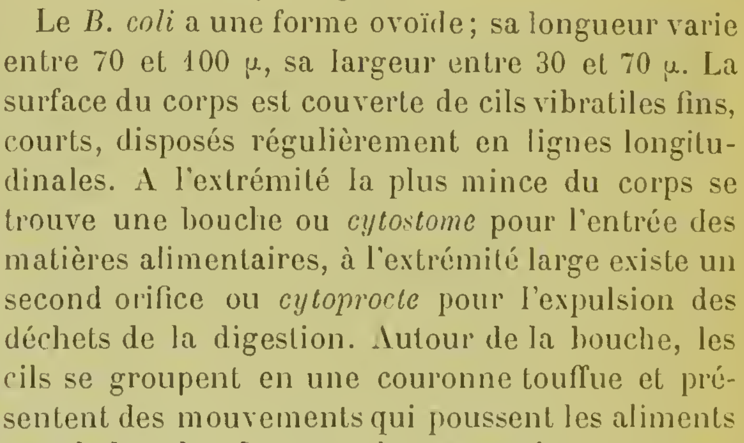
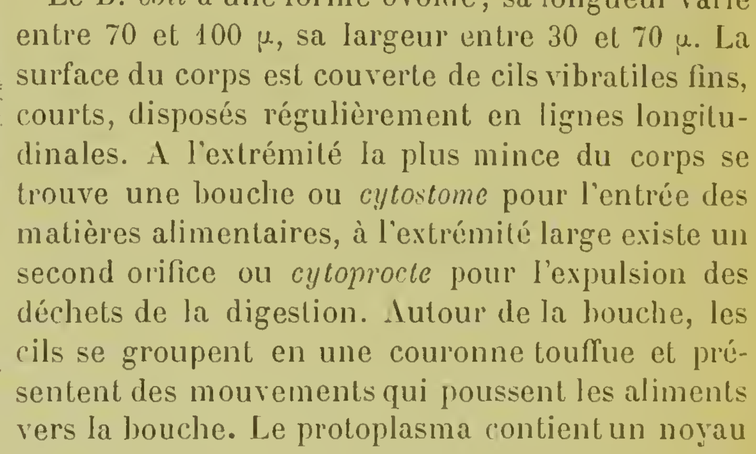


Fig. 276. — *Balantidium coli.*

Le *B. coli* a une forme ovoïde; sa longueur varie entre 70 et 100 μ, sa largeur entre 30 et 70 μ. La surface du corps est couverte de cils vibratiles fins, courts, disposés régulièrement en lignes longitudinales. A l'extrémité la plus mince du corps se trouve une bouche ou *cytostome* pour l'entrée des matières alimentaires, à l'extrémité large existe un second orifice ou *cytoprocte* pour l'expulsion des déchets de la digestion. Autour de la bouche, les cils se groupent en une couronne touffue et présentent des mouvements qui poussent les aliments vers la bouche. Le protoplasma contient un noyau et deux vacuoles contractiles; on y rencontre fréquemment des corps étrangers ingérés: globules sanguins, grains d'amidon, gouttelettes graisseuses, etc. La reproduction a lieu par division transversale.

Recherche. — La recherche du *Balantidium coli* doit être faite avec toutes les précautions que nous avons exposées à propos des Amibes.

TROISIÈME PARTIE

ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES

CHAPITRE PREMIER

ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE DE L'EAU

L'analyse chimique de l'eau ne peut renseigner que sur l'existence de souillures banales; elle permet de déceler la présence des matières organiques, nitrites, chlorures, sels ammoniacaux, etc. L'analyse bactériologique met en lumière les souillures banales de l'eau et permet en outre d'y rechercher la présence d'un certain nombre de microbes pathogènes.

L'analyse bactériologique d'une eau se compose de trois séries d'opérations :

1° Numération des germes (analyse quantitative) ;
2° Détermination des espèces dominantes ; } (analyse
3° Recherches de certains microbes pathogènes. } qualitative).

L'eau destinée à l'analyse doit être prélevée avec certaines précautions dont le but est d'éviter l'introduction de microbes étrangers dans l'échantillon; le transport au laboratoire doit être effectué dans des conditions telles que les germes contenus dans l'échantillon ne puissent se multiplier avant le moment de la mise en analyse, ce qui fausserait les résultats de la numération.

Article I. — PRÉLÈVEMENT ET TRANSPORT DE L'ÉCHANTILLON.

Prélèvement. — L'échantillon d'eau doit être récolté dans un flacon stérile. 200 à 300 grammes d'eau suffisent dans la plupart des cas; pour la recherche de certains germes pathogènes (Vibrion du

choléra par exemple), il est bon de disposer de 400 ou 500 centimètres cubes d'eau. On opérera de la façon suivante :

1° Préparer une fiole en verre blanc, neuve, de 200 à 300 centimètres cubes de capacité ; cette fiole est soigneusement rincée, séchée, puis bouchée à l'ouate et stérilisée au four Pasteur.

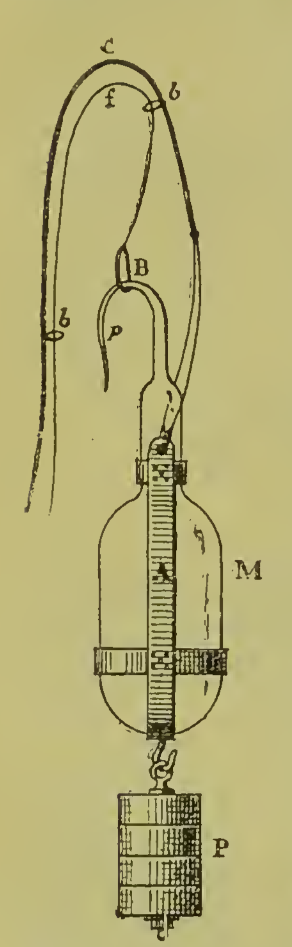


Fig. 277. — Appareil de Miquel pour prélever les eaux à diverses profondeurs.

2° Au moment de recueillir l'eau, flamber l'orifice de la fiole, enlever le bouchon d'ouate, emplir rapidement la bouteille avec l'eau à analyser et boucher avec un bouchon de liège fin, neuf et dont la surface vient d'être flambée (jusqu'à charbonnement très léger) dans la flamme d'une lampe à alcool. Le bouchon est soigneusement enfoncé, coupé au ras du goulot et recouvert de cire ou mieux d'une capsule de caoutchouc stérilisée ; sur la fiole on colle une étiquette indiquant la provenance de l'échantillon.

Le mode d'emplissage de la fiole varie suivant que l'eau provient d'une conduite, d'un puits, d'une rivière, etc. Quand on prélève l'échantillon au robinet d'une conduite, il faut avoir soin de laisser d'abord l'eau s'écouler pendant plusieurs minutes, pour éliminer le liquide qui a séjourné dans les tuyaux. De même, quand il s'agit d'une pompe, on doit pomper pendant dix à quinze minutes avant de recueillir l'échantillon, afin de se débarrasser de l'eau qui a séjourné dans le corps de pompe.

Dans une rivière, on immergera la fiole en ayant soin d'en diriger le col en sens contraire du courant ; on ne devra pas recueillir l'eau trop près du bord et on devra veiller à ce que des éboulis de terre ne viennent pas souiller le liquide au voisinage de l'endroit où l'on opère le prélèvement. — Quand un puits n'est pas pourvu de pompe, on peut y descendre le flacon à l'aide d'une ficelle, ou prélever l'échantillon dans un des seaux que l'on aura préalablement bien nettoyé et rincé avec l'eau du puits. Il est préférable cependant de s'adresser alors au *matras de Miquel*, qui permet de prélever l'échantillon dans la profondeur même et non uniquement à la surface de l'eau du puits.

Matras de Miquel. — On prend un matras d'essayeur dont on étire le

col de façon à obtenir une effilure coudée longue de 5 à 6 centimètres. L'effilure restant ouverte, on porte le matras dans la flamme de la lampe d'émailleur et on le stérilise en le chauffant fortement; du même coup l'air contenu dans l'appareil est expulsé, on scelle l'extrémité effilée avant que le matras n'ait commencé à se refroidir. Après refroidissement on entoure la partie inférieure du matras d'un cercle de plomb maintenu par des fils de fer et destiné à produire l'immersion; une longue corde, C, fixée à l'appareil permet de le descendre dans le puits. Un fil métallique mince, *f*, est enroulé et fixé autour de l'extrême pointe de l'effilure du matras; ce fil doit être assez long pour que l'opérateur en tienne constamment une extrémité en main, l'appareil étant immergé (fig. 277).

Pour faire la prise, l'opérateur, tenant la corde et le fil métallique, descend le matras dans le puits; quand l'appareil est arrivé à la profondeur désirée, l'opérateur tire brusquement sur le fil métallique et brise ainsi l'effilure : l'eau se précipite dans le matras, il ne reste plus qu'à remonter celui-ci et à sceller l'effilure brisée dans la flamme d'une lampe à alcool.

Appareils divers. — Il existe une grande variété d'appareils permettant le prélèvement de l'eau à une profondeur déterminée; le matras de Miquel suffit le plus souvent; nous citerons les modifications de G. Roux, Russell, Ogier; certains appareils, tels que celui de J.-H. Guillemin, assurent l'occlusion automatique du flacon aussitôt après son remplissage.

Transport. — Les germes se multipliant très rapidement dans l'eau à la température ordinaire, il importe que l'échantillon soit placé pendant tout le temps qui s'écoulera jusqu'au moment de l'analyse dans des conditions empêchant cette multiplication; on y parvient en maintenant l'échantillon aux environs de 0°; quand le laboratoire est éloigné, on utilisera de préférence le mode d'emballage suivant :

La fiole contenant l'échantillon est placée dans un étui métallique où elle doit entrer à frottement doux (un étui semblable à ceux qui contiennent le sulfate de quinine, certains vésicatoires, etc., convient très bien); pour plus de sécurité, on assure l'adhérence du couvercle et du corps de l'étui à l'aide d'une bague de caoutchouc disposée en couvre-joint. — L'étui ainsi préparé est placé dans une deuxième boîte métallique (une boîte à biscuits Palmers convient très bien) que l'on emplit de glace concassée en gros fragments; la boîte métallique elle-même est placée dans une caisse de bois de plus grandes dimensions, qui reçoit, autour de la boîte métallique, de la sciure de bois très modérément tassée. Ce dispositif permet à l'échantillon de rester à la température de la glace fondante pendant vingt-quatre à soixante-douze heures, suivant la saison et la quantité de glace employée; l'expédition au laboratoire devra toujours être faite par les voies les plus rapides.

On peut se passer de la deuxième boîte métallique et se contenter

d'entourer l'étui d'une certaine quantité de glace et de verser autour de la sciure de bois ; il faut alors une très grande quantité de sciure pour absorber l'eau de fusion de la glace.

Renseignements. — A chaque envoi d'eau on doit joindre certains renseignements destinés à éclairer l'expert et à le guider dans son appréciation ; nous donnerons comme exemple le questionnaire en usage dans les laboratoires du service de santé militaire :

Renseignements pour l'analyse de l'eau de.....

1° Autorité qui a prescrit l'analyse.

2° Causes qui motivent l'analyse (épidémie de....., source à capter, appréciation d'une eau de boisson.....).

3° Provenance de l'échantillon (source, puits, galerie filtrante, citernes, réservoirs,..... dire la profondeur du puits, de la citerne, du réservoir..... et la hauteur de l'eau au moment du prélèvement).

4° Point où l'échantillon a été recueilli (à l'origine d'une source ou au robinet d'une canalisation? dans un puits ou à la pompe qui le dessert?.....); — ne jamais recueillir le premier jet d'un robinet ou d'une pompe. — Si l'échantillon a été prélevé dans une rivière, un puits, un réservoir....., dire s'il provient de la surface ou du fond ou d'un point intermédiaire. Indiquer la date du dernier nettoyage des citernes ou réservoirs, dire s'il existe des poussières à la surface, des boues au fond.

5° Y a-t-il eu des chutes de pluie ou des fontes de neige dans les jours qui ont précédé le prélèvement de l'échantillon?

L'eau est-elle devenue trouble? Le niveau de l'eau est-il supérieur ou inférieur au niveau normal ?

6° Causes de souillures permanentes ou accidentelles auxquelles l'eau paraît exposée.

7° Usages auxquels l'eau est destinée (boisson, cuisines, lavabos, abreuvage des chevaux.....).

8° L'eau est-elle bue sans épuration préalable? Indiquer, s'il y a lieu, l'appareil d'épuration employé.

9° Température ambiante au moment du prélèvement de l'échantillon.

10° Température de l'eau au même moment.

11° Jour et heure du prélèvement.

12° Observations diverses.

Article II. — ANALYSE.

§ 1er. — NUMÉRATION DES GERMES.

On a proposé de très nombreux procédés de numération des germes de l'eau. Les uns (Miquel) sont basés sur la méthode d'isolement par dilution en milieux liquides (Voy. p. 82); les autres utilisent la méthode d'isolement sur plaques de gélatine (méthode de Koch). Nous ne pouvons entreprendre l'étude et la critique de ces diverses méthodes; nous décrirons avec soin les procédés que nous employons ordinairement.

Règles générales. — Dans la numération des germes de l'eau, on adopte généralement comme unité de volume le centimètre cube : on dit qu'une eau contient, par exemple, 50000 germes par centimètre cube.

La numération s'opérant toujours en milieux aérés, on ne tient pas compte des anaérobies ; quand on énonce le nombre de germes que contient une eau, on sous-entend toujours le mot *aérobies*. On pourrait, en utilisant les méthodes d'isolement des anaérobies, se renseigner également sur le nombre de ces microbes dans une eau, mais cette opération, grosse d'ailleurs de difficultés (présence des anaérobies facultatifs, etc.), n'est pas entrée dans la pratique.

On ne s'adresse jamais, pour la pratique de la numération, à un centimètre cube d'eau : cette quantité d'eau contient un trop grand nombre de microbes, les plaques seraient rapidement envahies et l'opération serait interrompue ; on opère sur une fraction de centimètre cube et l'on ramène ensuite le nombre obtenu à l'unité de volume.

A. **Procédé de la dilution.** — 1° Le goulot de la fiole contenant l'échantillon est débarrassé de la cire qui le recouvre, puis passé dans la flamme du bec de Bunsen ; avec un tire-bouchon flambé on soulève avec précaution le bouchon de façon à pouvoir l'enlever facilement par la suite à l'aide de deux doigts (1).

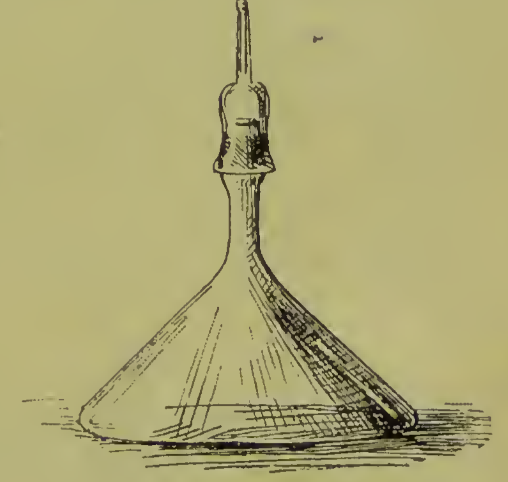


Fig. 278. — Fiole de Gayon.

2° Préparer sur la table de travail :

Une pipette graduée de 10 centimètres cubes ;

Une pipette graduée de 2 centimètres cubes ;

Un compte-gouttes normal, donnant 20 gouttes au centimètre cube ;

Tous ces instruments ont été flambés et leur grosse extrémité est bouchée à l'ouate ;

Un verre à pied, couvert de papier et flambé ;

Un tube d'eau stérilisée ;

Plusieurs tubes de gélatine stérilisée et liquéfiée au bain-marie ;

Plusieurs fioles de Gayon, bouchées à l'ouate et stérilisées (fig. 278).

(1) Avant de déboucher la fiole, l'agiter pour rétablir l'homogénéité du liquide et mélanger le dépôt qui a pu se produire au fond.

3° Avec les précautions ordinaires, on prélève avec la grande pipette 9 centimètres cubes d'eau stérile, que l'on porte dans le verre flambé.

Avec la pipette de 2 centimètres cubes, on prélève ensuite 1 centimètre cube de l'eau à analyser et on l'ajoute aux 9 centimètres cubes d'eau stérile; on mélange avec l'extrémité de la pipette. On a ainsi dilué au dixième l'eau à analyser.

4° On flambe le col de la fiole de Gayon, on enlève le bouchon d'ouate et avec le compte-gouttes normal on laisse tomber dans la fiole deux gouttes du mélange pris dans le verre. Ces deux gouttes représentent un dixième de centimètre cube du mélange, c'est-à-dire un centième de centimètre cube de l'eau à analyser.

5° On saisit un tube de gélatine liquéfiée (la température de la gélatine doit être telle que le tube puisse très aisément être conservé dans la main), on en flambe l'orifice et on verse rapidement le contenu dans la fiole de Gayon. On replace le bouchon d'ouate sur la fiole, puis on communique à celle-ci des mouvements d'oscillation pour bien mélanger les gouttes d'eau et la gélatine; cela fait, on dispose la fiole sur un plan horizontal et froid où la gélatine ne tarde pas à faire prise.

On a en définitive opéré un isolement sur plaque de gélatine portant sur un çentième de centimètre cube de l'eau à analyser.

6° Les colonies ne tardent pas à se développer sur la gélatine; chacun des germes contenus dans l'eau donne naissance à une colonie : compter ces colonies sera compter les germes contenus dans la gouttelette d'eau ensemencée. Chaque jour on inspecte la fiole en la retournant de façon à la voir par sa face plane; les colonies apparaissent par transparence à travers le fond de l'appareil. Si le troisième jour, par exemple, on note douze colonies, on écrira sur la feuille d'expérience :

3e jour.............................. 5 août 12 colonies.

Pour ne pas être exposé à compter deux fois les mêmes colonies, on les marque sur le fond de la fiole, au fur et à mesure de la numé ration, d'un point d'encre fait avec la plume à écrire.

Si le lendemain (quatrième jour), à côté des douze colonies marquées à l'encre, on en trouve huit nouvelles, la feuille d'analyse portera :

3e jour....................	5 août	12 colonies.	
4e —	6 —	20 —	(12 + 8).

Si le cinquième jour ont apparu dix colonies, on ajoute :

5e jour.................... 7 août 30 colonies (20 + 10).

La numération est d'ordinaire terminée du quinzième au ving-

tième jour; à cette époque aucune colonie nouvelle ne se développe plus. Supposons que l'on trouve alors :

20e jour	22 août	64 colonies,

on obtiendra le nombre de germes aérobies par centimètre cube en multipliant par 100 le chiffre 64, soit

$$64 \times 100 = 6\,400.$$

L'eau soumise à l'analyse contient donc 6 400 germes aérobies par centimètre cube.

Il est bon de préparer, pour un même échantillon, plusieurs fioles de Gayon que l'on numérote 1, 2, 3, etc. On fait la moyenne des résultats fournis par chaque opération et on obtient ainsi un chiffre beaucoup plus voisin de la réalité. Il arrive d'ailleurs fréquemment que les résultats obtenus avec chaque fiole soient les mêmes à un très petit nombre de bactéries près.

Mais, dans le cas que nous venons d'étudier, nous avons supposé que la liquéfaction de la gélatine ne venait pas entraver la numération. Il n'en est malheureusement pas ainsi le plus souvent; les eaux contiennent fréquemment, en proportion notable, des bactéries liquéfiantes, si bien que dès les premiers jours les plaques de gélatine peuvent être envahies par la liquéfaction : la numération devient alors impossible. On doit continuer la numération tant que la plaque n'est pas totalement envahie, puis on note la date de la liquéfaction. Si nous trouvons par exemple :

2e jour	26 colonies.
3e —	59 —
4e —	102 —
5e —	Liquéfaction totale.

nous formulons ainsi les résultats de l'analyse :

10 200 (102 × 100) *germes aérobies par centimètre cube ; ce chiffre est de beaucoup inférieur à la réalité, la liquéfaction de la gélatine ayant interrompu la numération dès le cinquième jour.*

Si la numération avait été interrompue seulement vers le huitième jour, on écrirait :

10 200 *germes aérobies par centimètre cube; ce chiffre est inférieur à la réalité, la liquéfaction de la gélatine ayant interrompu la numération le huitième jour.*

La phrase restrictive sera ajoutée toutes les fois que la liquéfaction sera survenue avant le dixième jour environ.

Remarque. — Beaucoup d'eaux renferment, à côté des bactéries, des moisissures qui se développent sur les plaques; on comptera

ces moisissures à part, on dira par exemple qu'une eau contient :

1 256 *germes aérobies et* 300 *moisissures par centimètre cube.*

B. **Procédé de la pipette au 1/50e de centimètre cube.** — La méthode des dilutions a l'inconvénient d'être un peu longue et de multiplier les causes de souillure entre des mains peu expérimentées, aussi lui préfère-t-on souvent ce procédé, beaucoup plus expéditif.

On utilise des pipettes fabriquées par Alvergniat, très soigneusement jaugées et donnant environ 50 gouttes au centimètre cube ; les difficultés de la construction ne permettent pas d'obtenir des pipettes donnant toutes exactement 50 gouttes, certaines donneront 48, 52, 54 gouttes au centimètre cube, mais chacune d'elles porte gravé sur le verre le nombre exact des gouttes qu'elle fournit au centimètre cube.

Supposons que nous ayons une pipette donnant 52 gouttes au centimètre cube ; après l'avoir flambée soigneusement, nous y aspirons un peu d'eau à analyser et nous laissons tomber une goutte de cette eau directement dans la fiole de Gayon ; nous ajoutons la gélatine et nous opérons la numération comme plus haut, à partir du temps 5.

En multipliant par 52 le chiffre des colonies développées dans la fiole, on obtient le nombre des germes aérobies par centimètre cube ; si nous avons compté 96 colonies, nous aurons :

$96 \times 52 = 4\,992$ germes aérobies par centimètre cube.

Il importe de faire toujours deux ou trois numérations et de prendre une moyenne.

APPRÉCIATION DES RÉSULTATS DE LA NUMÉRATION.

Les résultats de la numération doivent toujours être corroborés par ceux que fournit la détermination des espèces : on conçoit qu'une eau contenant un grand nombre de saprophytes inoffensifs (*B. subtilis*, Coccus blanc de l'eau, etc.) soit infiniment meilleure qu'une eau qui contiendrait en très petite quantité un bacille pathogène tel que le Bacille typhique. Cependant, au point de vue du degré de souillure banale de l'eau, la numération fournit des résultats importants. Miquel a construit une échelle permettant de juger une eau d'après sa teneur en germes, mais les indications de cette échelle ne sont aucunement absolues et ne doivent être prises en considération qu'après les résultats de l'analyse qualitative.

Échelle de Miquel.

0 à 10 germes	par	centimètre cube.....	Eau	excessivement pure.
10 à 100	—	—	—	très pure.
100 à 1 000	—	—	—	pure.
1 000 à 10 000	—	—	—	médiocre.
10 000 à 100 000	—	—	—	impure.
Plus de 100 000	—	—	—	très impure.

Remarque. — Les résultats de la numération n'ont rien d'absolu ; après ce que nous avons dit, dans cet ouvrage, du rôle des microbes empêchants, on comprendra que certaines bactéries ne se développent pas sur les plaques, empêchées qu'elles sont par la présence d'autres microbes. Ceci s'applique particulièrement aux bactéries pathogènes, qui ne se développent guère sur les plaques de gélatine où elles sont gênées par la présence des saprophytes et où elles se trouvent dans des conditions de température défavorables à leur culture. Il est évident que la méthode des dilutions, de Miquel, dans laquelle on se propose d'ensemencer un seul germe dans chaque tube de culture, n'est pas sujette à cette cause d'erreur ; malheureusement sa complication la rend peu pratique (Voy. p. 82).

§ 2. — DÉTERMINATION DES ESPÈCES.

A. — *ISOLEMENT DES ESPÈCES SAPROPHYTES.*

Pour isoler et étudier les espèces microbiennes contenues dans une eau, on a recours à la méthode d'isolement sur gélatine en boîtes de Petri, telle que nous l'avons décrite précédemment (p. 84). Une goutte de l'eau sert à ensemencer un tube de gélatine : après agitation, deux ou trois gouttes du contenu de ce tube sont reportées dans un second tube qui fournira la matière d'ensemencement d'un troisième. Sur les boîtes de Petri ainsi préparées on suit le développement des colonies et on pratique les prélèvements nécessaires pour les épreuves de détermination des germes.

La détermination des divers microbes des eaux exige, pour les commençants, de nombreuses recherches : chaque colonie doit être examinée à l'œil nu, au microscope, puis les microbes qui la constituent sont réensemencés dans les divers milieux, soumis à l'examen microscopique, inoculés aux animaux de laboratoire. Mais, avec un peu d'habitude, on arrive à reconnaître très aisément la plupart des colonies que l'on est exposé à rencontrer dans les eaux.

Il n'entre pas dans le cadre de cet ouvrage de décrire les espèces saprophytes des eaux. Certaines de ces espèces sont absolument inoffensives ; d'autres, telles que *Proteus vulgaris*, *Micrococcus prodigiosus*, etc., fabriquent des produits solubles capables de déterminer chez l'homme et les animaux des phénomènes d'intoxication ; ces espèces se développent de préférence aux dépens des matières animales en putréfaction, leur présence dans une eau doit faire porter un jugement défavorable sur cette eau. On ne devra jamais négliger de noter l'*odeur* exhalée par les plaques d'isolement ; les colonies de bactéries putrides exhalent des odeurs fétides, ammoniacales.

La méthode des plaques de gélatine ne permet pas de déceler la présence de la plupart des microbes pathogènes, aussi conseillons-nous de toujours pratiquer en même temps l'épreuve suivante que nous employons avec beaucoup de succès depuis 1894.

B. — RECHERCHE DES ESPÈCES PATHOGÈNES EN GÉNÉRAL.

Dans des tubes de bouillon ou mieux de pepto-gélo-sel de Metchnikoff, on ensemence 0,5 à 2 centimètres cubes de l'eau à analyser; les tubes sont immédiatement portés à l'étuve à 38°. Parfois il ne se produit aucun développement pendant les premières vingt-quatre heures, on peut alors interrompre la recherche et considérer les résultats comme définitivement négatifs. Souvent, au contraire, il se produit dès la cinquième à la huitième heure un trouble dans les tubes ensemencés. Ce trouble précoce est presque toujours dû à la présence de microbes pathogènes ou du *Bacterium coli*, les bactéries saprophytes se développant plus lentement à 38°. Dès que le trouble est marqué (sixième à dixième heure), on prélève une öse du contenu du tube et on pratique un second passage dans les mêmes conditions; dès que le deuxième tube est trouble, on en prélève une trace avec laquelle on pratique des isolements en stries sur plaques de gélose; les plaques sont placées dans une chambre humide à 37° et les colonies de pathogènes s'y développent très rapidement. Nous avons pu ainsi isoler de diverses eaux le Bacille du pus bleu, les microbes de la suppuration, le Bacille de Friedländer, le *Bacterium coli*.

La présence du *Bacterium coli* ou de bactéries voisines est fréquemment notée dans les eaux; jadis on attachait une grande importance à cette présence et l'on condamnait toute eau contenant le Bacille du côlon; aujourd'hui que les procédés de recherche se sont perfectionnés et que l'on trouve ce bacille dans un très grand nombre d'échantillons d'eaux, on tend à n'accorder aucune signification à sa présence et à le considérer comme un saprophyte banal. Pour nous la vérité se trouve entre ces deux opinions extrêmes : si la présence de bactéries coliformes est parfois insignifiante, on ne peut nier que le *Bacterium coli* n'indique souvent l'intervention directe d'une souillure fécale; de plus, il ne faut pas oublier que l'on trouve ce microbe dans un grand nombre d'échantillons d'eaux typhogènes où il peut masquer la présence du Bacille typhique.

Toutes les fois que nous isolons d'une eau un *Bacterium coli*, nous en étudions avec soin tous les caractères : s'il y a concordance absolue entre ces caractères et ceux du Bacille d'Escherich type (nous attachons une grande importance à la *coagulation rapide* du lait), et si le bacille étudié se montre pathogène pour le cobaye (0,5 à 1 centimètre cube de culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures inoculé dans le péritoine), nous n'hésitons pas à porter un jugement défavorable sur la qualité de l'eau en analyse. La présence conco-

mitante de bactéries de la putréfaction rendra encore plus probable l'origine fécale de la souillure.

Nous attribuons une grande importance à l'épreuve de l'inoculation aux animaux des microbes isolés des eaux et cultivant à 37°, nous ne négligeons jamais d'y avoir recours avant de porter un jugement définitif.

C. — RECHERCHE SYSTÉMATIQUE DE CERTAINS GERMES PATHOGÈNES.

Quand on se trouve en présence d'une épidémie de fièvre typhoïde, de choléra, de cas de charbon, etc., on recherche systématiquement dans l'eau les germes de ces maladies.

On recherche le plus ordinairement le *Bacterium coli*, le Bacille typhique, le Bacille de Friedländer, la Bactéridie charbonneuse, le Vibrion du choléra, etc. Dans la seconde partie de cet ouvrage, nous avons indiqué les méthodes spéciales s'appliquant à la recherche de chacun de ces différents microbes dans les eaux.

CHAPITRE II

ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE DE L'AIR

L'analyse bactériologique de l'air peut être quantitative ou qualitative, selon que l'on se propose de compter les microbes contenus dans un volume d'air ou que l'on veut déterminer à quelles espèces appartiennent ces germes; enfin on peut chercher dans l'air la présence d'un germe pathogène donné.

L'air contenant un nombre restreint de microbes, on adopte comme unité de volume le mètre cube : on dit par exemple que l'air d'une salle contient 500, 1 000, 3 000 germes par mètre cube.

Longtemps on s'est contenté de pratiquer l'examen microscopique des poussières de l'air recueillies à l'aide d'un *aéroscope*. L'aéroscope le plus employé en France est celui de Pouchet. C'est un petit cylindre de verre fermé à sa partie supérieure et à sa partie inférieure. A l'intérieur, vers la partie moyenne, un chevalet soutient une lame porte-objet maintenue par deux valets et au centre de laquelle on dépose une goutte de glycérine; le plafond de l'appareil est percé à son centre d'un orifice circulaire portant un petit entonnoir de platine, dont la douille plonge dans le cylindre en face du centre de la lame porte-objet. Une tubulure située à la partie inférieure de l'aéroscope est reliée à un aspirateur. L'aspirateur fonctionnant, l'air extérieur appelé par l'entonnoir vient se briser contre la lame porte-objet et y abandonne ses poussières qui sont retenues grâce à la viscosité de la glycérine. Quand on a fait passer une quantité d'air suffisante, on arrête l'aspiration, on enlève la lame de verre, on dissémine les poussières dans la glycérine à l'aide d'une aiguille stérilisée, on recouvre d'une lamelle et on porte sous le microscope. On peut ainsi étudier les poussières grossières de l'air : spores de champignons, de moisissures, pollen, grains d'amidon, corpuscules minéraux, etc.; mais les bactéries et leurs spores échappent à ce mode de recherche. Aussi aujourd'hui emploie-t-on presque uniquement la méthode des cultures.

A. — PROCÉDÉS ANCIENS.

I. **Procédé de Pasteur.** — C'est le plus anciennement employé. Pasteur prend une série de ballons à long col emplis au tiers de bouillon de veau; le col de chacun de ces ballons est étiré à la lampe, puis le ballon est stérilisé et son effilure fermée d'un trait de chalumeau, le bouillon étant encore en ébullition. Le ballon est

ainsi privé d'air, il suffit de le transporter au lieu où l'on doit effectuer le prélèvement et d'en briser l'effilure, l'air s'y précipite avec les poussières qu'il renferme; le col est alors scellé de nouveau et le ballon est abandonné à lui-même. On répète l'opération avec un grand nombre de ballons. Bientôt le contenu d'un certain nombre de ces ballons se trouble ; du nombre des ballons troublés, on déduit le nombre des germes contenus dans l'atmosphère.

Si, par exemple, on a opéré avec 50 ballons dont chacun contient approximativement 500 centimètres cubes d'air et si 20 de ces ballons ont troublé, on dira : 25 litres d'air ont donné 20 germes, un mètre cube renferme par conséquent, très approximativement, $\frac{20}{25} \times 10000$, c'est-à-dire 8 000 germes.

Cette méthode exige un matériel considérable et encombrant, on ne peut y avoir recours dans la pratique.

II. **Procédé de Koch.** — Le procédé de Koch consiste à exposer à l'air, pendant un temps plus ou moins long, des plaques de gélatine, sur lesquelles on étudie les colonies qui se développent par la suite; il ne peut être utilisé pour l'analyse quantitative.

III. **Procédé de Hesse.** — Hesse a indiqué un procédé basé sur le principe de l'aéroscope et qui a le mérite de la simplicité; malheureusement il ne fournit que des résultats approximatifs.

On prend un tube de verre long de 50 à 70 centimètres et ayant 4 à 5 centimètres de diamètre (fig. 279). On obstrue une de ses extrémités



Fig. 279. — Tube de Hesse.

avec un bouchon de caoutchouc traversé par un tube de verre muni d'un tampon d'ouate; son autre extrémité est recouverte de deux capsules de caoutchouc superposées; la plus interne de ces capsules porte à son centre un trou de un centimètre de diamètre. On stérilise l'appareil, puis on y introduit par la capsule perforée environ 50 centimètres cubes de gélatine stérilisée liquéfiée, on remet immédiatement la deuxième capsule de caoutchouc, on place le tube dans une position horizontale et on laisse faire prise à la gélatine : celle-ci doit constituer dans le tube une couche régulière à surface horizontale, n'atteignant pas le niveau de l'orifice du petit tube de verre ni celui de l'ouverture du capuchon de caoutchouc. L'appareil est alors prêt à servir : au moment du besoin on enlève le premier capuchon

de caoutchouc, on relie le petit tube de verre à un aspirateur et on fait passer lentement 10 à 15 litres d'air. L'air entre par le trou du capuchon de caoutchouc, vient lécher la surface de la gélatine et y abandonne ses poussières. L'aspiration terminée, on replace la deuxième capsule de caoutchouc et on porte l'appareil à l'étuve à 20°. Des colonies apparaissent bientôt sur la gélatine; elles sont plus nombreuses dans la première partie du tube; on les compte et on fait les prélèvements nécessaires pour la détermination des espèces. Si l'on a fait passer 15 litres d'air et que l'on compte dans le tube 6 colonies bactériennes et 10 moisissures, l'air contiendra approximativement :

$$\frac{6}{15} \times 10\,000 = 4\,000 \text{ bactéries aérobies par mètre cube,}$$

et

$$\frac{10}{15} \times 10\,000 = 6\,666 \text{ moisissures par mètre cube.}$$

Mais beaucoup de germes s'accolent aux parois du tube et sont perdus pour la numération; de plus, si l'opération se poursuit pendant un certain temps, la gélatine se dessèche et devient impropre à la culture; enfin le courant d'air doit être très lent, sans quoi beaucoup de germes sont entraînés.

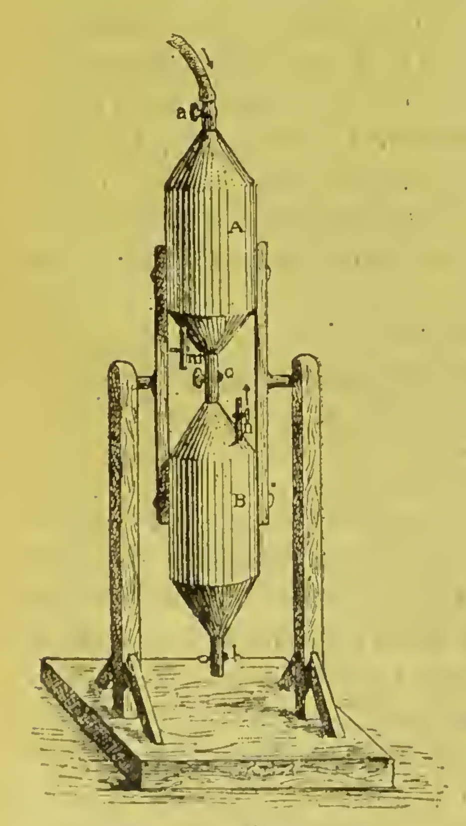


Fig. 280. — Aspirateur à eau.

B. — PROCÉDÉS ACTUELLEMENT EMPLOYÉS.

Aux procédés que nous venons d'étudier on préfère aujourd'hui ceux qui consistent à dépouiller l'air de ses germes au moyen du barbotement dans un peu de liquide visqueux, ou de la filtration sur un corps pulvérulent. On obtient ainsi sous un petit volume la totalité des germes contenus dans le volume d'air étudié; ces germes sont, ou disséminés dans le liquide, ou mélangés à la poudre qui constitue le filtre; on n'a plus alors qu'à opérer selon les méthodes générales que nous avons exposées à propos de l'isolement des germes et des analyses d'eau. Il sera toujours bon de pratiquer des isolements sur plaques de gélose, en

même temps que les isolements sur gélatine, les plaques de gélatine étant d'ordinaire liquéfiées en peu de temps.

La mise en pratique de ces procédés d'analyse de l'air exige l'emploi d'appareils aspirateurs ; on utilise de préférence l'aspirateur à eau (fig. 280) en usage dans les laboratoires de chimie, qui permet de mesurer très exactement la quantité d'air aspirée. On peut encore employer la trompe à eau, mais il faut, dans ce cas, interposer, entre l'appareil à barbotement et la trompe, un compteur à gaz qui renseignera sur les quantités d'air aspirées. L'aspiration doit toujours être lente, régulière, les bulles doivent éclater une à une dans le liquide du barboteur. De nombreux appareils permettent d'appliquer le principe du barbotement et de la filtration.

PROCÉDÉS PAR FILTRATION.

I. **Bourres insolubles.** — 1° **Procédé de Petri.** — Dans un tube de verre de 10 centimètres de long sur 15 millimètres de diamètre, on dispose à chaque extrémité une paire de petits culots de toile métallique (b^1, b^2, b^3, b^4, fig. 281), délimitant deux loges (c^1 et c^2) de 3 centimètres de long que l'on remplit de sable très fin préalablement porté au rouge. On bouche à l'ouate les deux extrémités du tube et on stérilise le tout au four Pasteur. L'appareil refroidi, on remplace un des tampons d'ouate par un bouchon de caoutchouc perforé stérilisé, *d*, portant un tube de verre muni d'une bourre d'ouate, *f*. Pour l'usage, on relie ce dernier tube à l'aspirateur, on enlève le tampon d'ouate de l'autre extrémité de l'appareil et on fait passer lentement 100 litres d'air. L'aspiration terminée, on dissémine le sable des bourres dans de la gélatine avec laquelle on prépare des plaques de Petri. Ce procédé est compliqué et peu pratique.

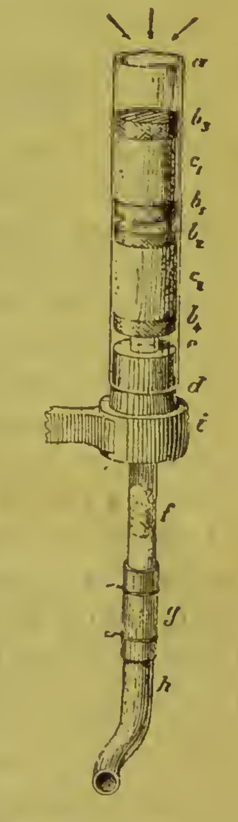


Fig. 281. — Filtre à sable de Petri pour l'analyse de l'air.

2° **Procédé de Frankland.** — On prépare des tubes analogues à ceux de Petri, mais en remplaçant le sable par du coton de verre ou de l'amiante, ce qui supprime l'emploi des culots métalliques. Après aspiration, la bourre est dissociée dans une quantité connue de bouillon qui sert à ensemencer des plaques de gélatine. Cette méthode très simple n'est pas précise : les germes adhèrent à

l'amiante ou au coton de verre et leur dissémination dans le bouillon n'est jamais complète.

II. **Bourres solubles** (Pasteur). — La substitution des poudres solubles aux bourres insolubles a pour effet de permettre l'exacte répartition des germes dans la gélatine et de rendre par conséquent très rigoureux les résultats de la numération. Malheureusement, ce procédé n'est pas applicable quand l'atmosphère est chargée d'humidité; les bourres s'hydratent, deviennent déliquescentes et ne retiennent plus les germes.

On utilise d'ordinaire comme bourre la poudre de sulfate de soude. On fond le sel dans un vase en fer, on le pile, on tamise la poudre obtenue et on la place dans un tube de verre disposé ainsi que l'indique la figure 282. Une des extrémités du tube est bouchée

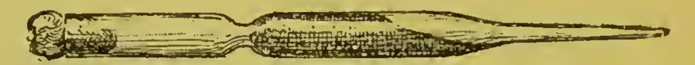


Fig. 282. — Filtre à bourre soluble.

à l'ouate, au-dessus existe un étranglement qui retient une petite bourre d'amiante sur laquelle on place la poudre de sulfate de soude sur une hauteur de 8 centimètres environ; enfin, on étire et ferme à la lampe la seconde extrémité du tube. On stérilise l'appareil dans le four de Pasteur. Pour l'usage, on tasse la poudre contre le tampon d'amiante par de légères secousses imprimées à l'appareil, puis on casse l'extrémité effilée du tube et on met l'extrémité bouchée à l'ouate en communication avec un aspirateur.

L'opération terminée, on fait tomber dans une quantité connue de bouillon la poudre de sulfate de soude; dès que la dissolution est complète, on utilise le bouillon pour ensemencer les plaques d'isolement. Comme contrôle, on porte avec une pince flambée la bourre d'amiante dans un tube de bouillon qui doit rester stérile.

PROCÉDÉS PAR BARBOTEMENT.

I. **Procédé de Straus et Wurtz.** — Un cylindre de verre porte à son extrémité inférieure un petit appendice qui reçoit 10 centimètres cubes de gélatine liquéfiée, à la surface de laquelle on place quelques gouttes d'huile (fig. 283).

La partie supérieure du cylindre porte une tubulure latérale munie d'un tampon d'ouate et un orifice central rodé, obturé hermétiquement par un tube de verre dont l'extrémité inférieure plonge jusqu'au fond de l'appendice à gélatine et dont l'extrémité supérieure, se terminant au dehors, est munie d'un tampon d'ouate. On

stérilise l'appareil à l'autoclave. Pour l'usage, on plonge l'appendice inférieur dans de l'eau à 40° environ, pour liquéfier la gélatine, on relie la tubulure latérale à un aspirateur et on enlève la bourre d'ouate qui obturait le tube central. L'air aspiré descend par le tube central et vient barboter dans la gélatine où il se dépouille de ses germes (la couche d'huile empêche la gélatine de mousser pendant l'opération). Quand on a fait passer 10 litres d'air, on arrête l'aspiration. En soufflant doucement par la tubulure latérale, on fait monter la gélatine plusieurs fois dans le tube central pour le laver ; enfin on prépare des plaques avec la gélatine.

Cet appareil est très commode, mais beaucoup de germes s'arrêtent dans le tube d'arrivée qui est très long et présente des irrégularités, aussi les résultats obtenus ne sont-ils pas très rigoureux ; de plus, on ne peut opérer que sur une petite quantité d'air.

II. Procédé de Miquel. — Un ballon Pasteur porte une tubulure centrale descendant jusqu'au fond de sa panse et deux tubes latéraux situés à la partie supérieure. Un capuchon de verre rodé obture le tube central; une des tubulures latérales est bouchée à l'ouate, l'autre est effilée et fermée à la lampe, elle sert à la répartition du liquide



Fig. 283. — Appareil de Straus et de Wurtz.

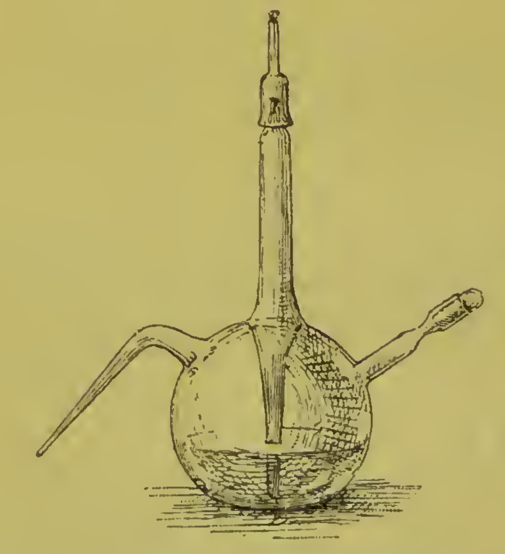


Fig. 284. — Ballon de Miquel.

quand l'opération est terminée (fig. 284). On place dans le ballon 30 centimètres cubes d'eau et on stérilise le tout à l'autoclave. Pour l'usage, on relie à l'aspirateur la tubulure bouchée à l'ouate et on

enlève le capuchon de verre qui couvre la tubulure centrale. Pendant l'aspiration, l'air barbote dans l'eau du ballon ; quand l'aspiration est terminée, on fait monter plusieurs fois le liquide dans la tubulure centrale pour la laver et recueillir les germes qui s'y sont déposés, puis on brise l'extrémité de la tubulure effilée et on répartit le liquide dans un grand nombre (trente à cinquante) ballons de culture contenant du bouillon. La plongée du tube dans le liquide n'est pas suffisante et beaucoup de germes échappent à l'observation.

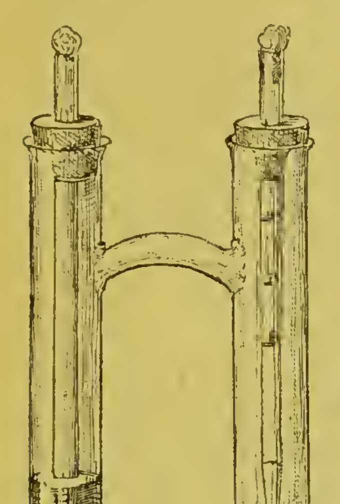


Fig. 285. — Tube de Laveran.

III. **Procédé de Laveran.** — *Procédé de choix.* — Laveran emploie un dispositif très simple, peu fragile et qui donne des résultats très exacts. Deux tubes de verre fermés à leur extrémité inférieure sont réunis au niveau de leur tiers supérieur par une tubulure horizontale. Chacun des tubes verticaux est obturé à sa partie supérieure par un bouchon de caoutchouc traversé par une pipette qui plonge jusqu'à la partie inférieure de l'appareil. Un des tubes porte un trait gravé sur le verre et délimitant une capacité de 10 centimètres cubes à partir du fond du tube ; une des pipettes est graduée en dixièmes de centimètre cube; l'orifice supérieur de chaque pipette est obturé par un tampon d'ouate ; dans le tube jaugé on place 10 centimètres cubes d'eau sucrée à 1 p. 100, puis l'appareil est stérilisé à l'autoclave.

Pour l'usage, on enlève le tampon de coton garnissant la pipette qui plonge dans l'eau sucrée et on met l'autre pipette en communication avec l'aspirateur. L'air aspiré barbote dans l'eau sucrée, passe dans la première branche, s'engage dans le tube horizontal, descend dans la deuxième branche et s'échappe par la pipette en communication avec l'aspirateur. On peut faire passer ainsi une très grande quantité d'air dans l'appareil.

Le barbotement terminé, on aspire doucement l'eau sucrée dans la pipette d'entrée, de manière à la laver, puis on fait passer le liquide dans la deuxième branche et dans la deuxième pipette à plusieurs reprises différentes pour recueillir les germes qui ont pu s'y déposer ; il ne reste plus alors qu'à prélever l'eau sucrée à l'aide de la pipette graduée pour la répartir dans les différents milieux de culture (plaques de gélatine, plaques de gélose).

Si, p r exemple, il est passé 200 litres d'air dans l'appareil et que

l'ensemencement en plaque de gélatine d'un centimètre cube d'eau sucrée donne douze colonies, nous avons :

200 litres d'air contiennent 12×10 germes aérobies.

1 mètre cube d'air contient $\frac{12 \times 10 \times 10\,000}{200} = 6\,000$ germes aérobies.

Cette méthode présente l'avantage de fournir un matériel d'ensemencement abondant, représentant une grande quantité d'air et permettant la préparation de nombreuses plaques d'isolement et aussi la pratique des recherches spéciales des microbes pathogènes (1).

(1) Voyez ce qui a été dit à propos de chacun de ces microbes. La recherche du Bacille tuberculeux devra toujours être faite par la méthode des inoculations au cobaye.

FIN.

TABLE ANALYTIQUE DES MATIÈRES

DEUXIÈME PARTIE

TECHNIQUE SPÉCIALE

TROISIÈME PARTIE

ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES

TABLE ALPHABÉTIQUE DES MATIÈRES

A

D

E

T

FIN DE LA TABLE ALPHABÉTIQUE DES MATIÈRES.

205-01. — Corbeil. Imprimerie Éd. Crété.

BACTÉRIOLOGIE — MICROBIOLOGIE

BÉRIER (A.). — *Bactériologie de la Grippe*. 1892, in-8, 104 p. 2 fr. 50
BESSON (A.). — *Technique microbiologique et sérothérapique*. Guide pour les manipulations du laboratoire. 2e *édition*. 1901, 1 vol. in-8 de 700 p. avec 250 fig. noires et coloriées.............................. 10 fr.
BONNIER (P.). — *Nécessité de l'Examen bactériologique* pour le diagnostic des angines diphtériques. 1894, gr. in-8, 96 p....... 2 fr. 50
BOUCHARD (Ch.). — *Les Microbes pathogènes*, par Ch. BOUCHARD, professeur à la Faculté de médecine de Paris, membre de l'Institut. 1892, 1 vol. in-16 de 304 p.............................. 3 fr. 50
BOUNHIOL (J.). — *Etude clinique sur la nouvelle Tuberculine* TR. de Koch 1899, gr. in-8, 84 p.............................. 2 fr. 50
BROCHARD (V.). — *Isolement du Bacille typhique*. 1899, in-8, 60 p. 2 fr. 50
COYON. — *Flore microbienne de l'Estomac*. 1900, gr. in-8, 132 p. avec 6 pl. color.............................. 12 fr.
DESPEIGNES (V.). — *Etudes expérimentales sur les Microbes des Eaux*. 1890, gr. in-8, 126 p.............................. 3 fr.
DUCLAUX (E.). — *Le Lait*, études chimiques et microbiologiques, par E. DUCLAUX, membre de l'Institut, professeur à la Faculté des sciences et à l'Institut agronomique. 2e *édition*, 1894, 1 vol. in-16, 376 p. et fig.............................. 3 fr. 50
DUPONT (A.). — *Tableaux synoptiques de Bactériologie médicale*. 1901, 1 vol. in-16, 75 p. cart.............................. 1 fr. 50
FEITU. — *De l'Agglutination du Bacille de Koch* par les épanchements tuberculeux, 1901. gr. in-8, 181 p.............................. 5 fr.
FELTZ (L.). — *Guide pratique pour les Analyses de Bactériologie clinique*. 1898, 1 vol. in-18 de 282 p., avec 111 fig. noires et coloriées, cart. 3 fr.
— *Le Proteus vulgaris*. 1900, 1 vol. in-8 de 110 p., avec 3 pl. coloriées.............................. 4 fr.
GARNIER (L.). — *Ferments et Fermentations*, Etude biologique des ferments, rôle des fermentations dans la nature et l'industrie, par Léon GARNIER, professeur à la Faculté de Nancy. 1888, 1 vol. in-16 de 318 p., avec 65 fig.............................. 3 fr. 50
GOUPIL (P.). — *Tableaux synoptiques pour l'Analyse bactériologique de l'Eau*. 1901, 1 vol. in-16 de 75 p. avec fig. cart......... 1 fr. 50
GUILLAUD. — *Les Ferments figurés*. Schizomycètes, levures et bactéries. 1876, in-8, 117 p.............................. 2 fr. 50
KROGIUS. — *Recherches bactériologiques sur l'Infection urinaire* 1892, gr. in-8 de 109 p., avec 3 pl.............................. 4 fr.
LEFERT (P.). — *Aide-Mémoire de Bactériologie*. 1901, in-18, 275 p. cart. 3 fr.
LIPPMANN. — *Le Pneumocoque*. 1900, 1 vol. in-16, 96 p. avec fig. cart.............................. 1 fr. 50
MACÉ (E.). — *Traité pratique de Bactériologie*, par E. MACÉ, professeur à la Faculté de médecine de Nancy, directeur de l'Institut sérothérapique de l'Est, 1900, 4e *édition*, mise au courant des travaux les plus récents, 1 vol. gr. in-8 de 1200 p., avec 338 fig. noires et color. 25 fr.
— *Atlas de Microbiologie*. 1898, 1 vol. gr. in-8 de 60 pl. color. (8 couleurs), cart.............................. 32 fr.
MALAPERT-NEUVILLE (R. de). — *Examen bactériologique des Eaux naturelles*. 1883, in-8, 60 p., avec 32 fig.............................. 2 fr.

